Année 1965

THÈSES

PRÉSENTÉES ET SOUTENUES PUBLIQUEMENT

FACULTÉ DE PHARMACIE

UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

Jean-Claude DELARUE

Ancien Interne des Hôpitaux de Paris.

1re *THÈSE.* — SUR L'ÉTUDE ANALYTIQUE ET BIOCHIMIQUE DES PROTÉINES NUCLÉAIRES ASSOCIÉES A L'ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE APRÈS SON EXTRACTION

2e *THÈSE.* — Proposition donnée par la faculté :

LE VANADIUM. ASPECTS TOXICOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE

MM. TRUHAUT, *Président.*
COURTOIS, *Professeur.*
PAOLETTI, *Maître de Conférences.*

LUISANT-CHARTRES
IMPRIMERIE DURAND

1965

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544307_0051

Année 1965

THÈSES

PRÉSENTÉES ET SOUTENUES PUBLIQUEMENT

FACULTÉ DE PHARMACIE

UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

Jean-Claude DELARUE

Ancien Interne des Hôpitaux de Paris.

1re *THÈSE.* — SUR L'ÉTUDE ANALYTIQUE ET BIOCHIMIQUE DES PROTÉINES NUCLÉAIRES ASSOCIÉES A L'ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE APRÈS SON EXTRACTION

2e *THÈSE.* — Proposition donnée par la faculté :

LE VANADIUM. ASPECTS TOXICOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE

MM. TRUHAUT, *Président.*
COURTOIS, *Professeur.*
PAOLETTI, *Maître de Conférences.*

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

M. G. Valette, O ✲, O Ord Nat du Mérite, C ◍	Doyen.
M. MM. Janot, O ✲, C ◍	Assesseur.
M. P. Malangeau, O ◍	Assesseur.
M. L. Rodineau, ✲, O ◍	Secrétaire Général.
Mme S. Ferrari, ◍	Attachée Principale.
Mme M. L. Espinasse, O ◍	Attachée.
M. L. Jeandel, O ◍	Attaché.
Mme C. Peillon	Attachée.
Mme G. Renneteau	Attachée.
M. A. Brenn, ✲	Attaché.
Mlle G. Bideau	Secrétaire.
Mme S. Certain, O ◍	Secrétaire.
Mme M. Cousin	Secrétaire.
M. A. Drouilly, O ◍	Secrétaire.
Mme T. Rouveure	Secrétaire.
Mme L. Warnesson, ◍	Secrétaire.

DOYEN HONORAIRE

M. R. Fabre, C ✲, C ◍	Membre de l'Institut.

PROFESSEURS HONORAIRES

M. M. Delépine, C ✲, C ◍	Membre de l'Institut.
M. L. Launoy, O ✲, O ◍	
M. P. Fleury, O ✲, C ◍	
M. M. Picon, O ✲, O ◍	
M. C. Bedel, ✲, O ◍	
M. R. Fabre, C ✲, C ◍	Membre de l'Institut.

PROFESSEURS

M. M. M. Janot, O ✲, C ◍	Pharmacie galénique (T).
M. G. Valette, O ✲, O Ord Nat du Mérite, C ◍	Pharmacodynamie (T).
M. R. Paris, ✲, O ◍	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T).
M. M. Guillot, ✲, O ◍	Physique (T),
M. J. A. Gautier, ✲, O ◍	Chimie organique (T),
Mlle S. Lambin, ✲, O ◍	Microbiologie (T).
M. Y. Raoul, ✲, O ◍	Physiologie (T).
M. J. Courtois, ✲, O ◍	Chimie biologique (T).
M. L. Domange, ✲, C ◍	Chimie minérale (T).
M. P. Crète, ✲, O ◍	Botanique (T).
M. R. Truhaut, O ✲, O ◍	Toxicologie et Hygiène industrielle (T).
M. A. Morette, ✲, O ◍	Hydrologie (T).
M. R. Cavier, O ◍	Parasitologie (T).

M. A. Quevauviller, ✲, O ◍	Hygiène et Éducation Sanitaire (T).
M. R. Moreau, ✲, O ◍	Pharmacie chimique (T).
M. A. German, O ◍	Virologie et Sérologie (T).
M. M. Piette, ✲, O ◍	Biologie sanguine (T).
M. P. Malangeau, O ◍	Chimie analytique (T).
M. M. Girard, O ◍	Biochimie appliquée (T).
M. G. Dillemann	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T).
M. G. Deysson, O ◍	Cytologie végétale (T).
M. J. Flahaut, ◍	Minéralogie (T).
M. C. Boudène	Toxicologie et Hygiène industrielle (T).
M. J. Renault, ◍	Chimie organique (T).
M. A. Le Hir	Pharmacie galénique.
M. P. Laruelle	Physique.
M. P. Rossignol	Pharmacodynamie.
M. A. Mangeot, O ◍	Pharmacie galénique industrielle.
M. P. Delaveau	Matière médicale.
M. Y. Cohen	Sciences naturelles.
M. H. Renault	Physique.
M. R. Bourdon	Chimie analytique.
M. P. Reynaud	Sciences Physico-chimiques.

MAITRES DE CONFÉRENCES

M. G. Le Moan	Sciences appliquées.
M. C. Paoletti	Sciences appliquées.
M. J. Poisson	Sciences naturelles.
M. A. Desvignes, ◍	Cryptogamie et technique bactériologique.
M. F. Percheron	Sciences appliquées.
M. J. Savel	Biologie animale.
M. J. Bory, ◍	Sciences naturelles.
M. M. Miocque	Chimie organique.
M. J. L. Guignard	Botanique générale.
M. J. C. Gounelle	Sciences naturelles.
M. P. Binet	Biologie animale et Zoologie.
M. C. Combet-Farnoux	Chimie organique.
Mme M. Plat	Sciences appliquées.
M. E. Delacoux	Sciences physico-chimiques.
M. J. Didry (F. F.)	Mathématiques appliquées aux Sciences expérimentales.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

Mme J. Blanc (F. F.)	Chimie analyses (1re année N.).
M. A. Carlier (F. F.)	C.E.S. Pharmacie galénique Industrielle.
M. J. Charles (F. F.)	Mathématiques.
M. C. Dragon (F. F.)	Chimie préparations (1re année N.).
Mlle M. T. Decaudin (F. F.)	Biologie animale (3e année).
M. C. Dreux (F. F.)	C.E.S. Électrochimie appliquée à l'analyse.
Mlle G. Dumant (F. F.)	Chimie préparations (1re année N.).
M. P. Georges (F. F.)	C.E.S. Parasitologie.
M. P. Gesteau, ✲, O ◍	C.E.S. Biochimie.
Mlle M. J. Goursat (F. F.)	Chaire de botanique.
M. H. Guérin ✲, O ◍	Biologie végétale (3e année).

M. M. Guernet	Chimie (2e et 3e années).
M. M. Hamon (F. F.)	Chimie analyses (1re année N.).
M. J. Harispe ✲ O ⚙	Chimie préparations (1re année).
M. G. Hazebroucq (F. F.)	Physique.
M. J. Henry	Chimie (4e année).
Mme J. Hubert	C.E.S. Bactériologie.
Mme M. J. Huron (F. F.)	Mathématiques.
Mlle Y. Jund	C.E.S. Microbiologie.
M. J. Laroche	Chaire de Physique.
M. M. Lebœuf (F. F.)	C.E.S. Pharmacotechnie.
Mme N. Léger (F. F.)	Zoologie.
M. R. Leluc	Microbiologie (4e année).
M. A. Lemonnier	Chimie analyses (2e et 3e années).
Mme S. Lemontey	Chimie (4e année).
Mlle M. Longevialle (F. F.)	Chaire de botanique.
Mlle S. Longuevalle, O ⚙	Chimie examens.
M. J. Mandereau (F. F.)	C.E.S. Pharmacotechnie.
M. H. Martin Frère (F. F.)	Chimie préparations (1re année N.).
Mlle H. Morin, O ⚙	C.E.S. Pharmacodynamie.
M. H. Moskowitz (F. F.)	Chimie analyses (1re année N.).
Mme M. J. Notteghen (F. F.)	Zoologie.
M. Nguyen Phu Lich	C.E.S. Toxicologie.
M. M. Paris (F. F.)	C.E.S. Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Biologie).
M. R. Perles	C.E.S. Biochimie.
M. J. Pestis (F. F.)	Biologie animale (2e année).
M. P. Poullain	C.E.S. Hématologie.
M. J. Rivet (F. F.)	Chaire de Physique.
Mme M. Robert	C.E.S Sérologie.
Mlle A. Rollen, ✲, O ⚙	Biologie végétale (2e année).
Mlle L. Seguin, O ⚙, (F. F.)	C.E.S. Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Physico-chimie).
Mme M. Seiller (F. F.)	Pharmacie galénique industrielle.
M. J. Yonger (F. F.)	Chimie analyses (1re année).

BIBLIOTHEQUE

Mlle Y. Ruyssen, ✲, O ⚙	Conservateur, chargée de la Direction.
Mlle S. Lavaud, ✲, O ⚙	Conservateur.
Mme G. Krehmer, O ⚙	Conservateur.
Mme A. Desgrippes, O ⚙	Bibliothécaire.

A LA MÉMOIRE DE MA MÈRE,
A MA FEMME,
A MON PÈRE,

en témoignage de ma très profonde affection.

A MA FAMILLE.
A MES AMIS.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. TRUHAUT,

Professeur de Toxicologie et d'Hygiène Industrielle à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Pharmacien Chef des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine,

Chef de l'Unité de Chimiothérapie de l'Institut Gustave Roussy,

Officier de la Légion d'Honneur.

qui nous a fait le grand Honneur de nous compter parmi ses élèves et dès lors n'a cessé, malgré ses lourdes responsabilités, de nous prodiguer ses conseils.

Nous avons pu profiter de sa compétence incomparable en de nombreux domaines et nous avons été très souvent stimulé par son enthousiasme scientifique et son inlassable activité.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profond respect, de notre indéfectible gratitude et le témoignage de notre fidèle attachement.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J. E. COURTOIS,

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Pharmacien Chef des Hôpitaux de Paris,

Chevalier de la Légion d'Honneur.

qui a bien voulu nous faire l'honneur de juger notre travail.

Nous lui exprimons nos sentiments de reconnaissance et de respectueux dévouement.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ C. PAOLETTI,

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Chef de l'Unité de Biochimie et Enzymologie de l'Institut Gustave Roussy,

Pharmacien Chimiste de première classe de la Marine,

qui a bien voulu accepter de diriger notre thèse avec une efficace et souriante compétence.

Son enthousiasme scientifique et son dynamisme nous ont été souvent d'un grand réconfort.

Qu'il veuille bien accepter nos remerciements les plus vifs et qu'il soit assuré de notre respectueux attachement.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ C. BOHUON,

Professeur de Toxicologie à l'École de Médecine et de Pharmacie de Rouen,

Chef des Unités de Biologie Clinique et de Biologie Expérimentale de l'Institut Gustave Roussy.

Il nous est difficile d'exprimer ici tout ce que nous devons à celui qui, depuis trois ans, a été notre guide journalier et dont l'amitié, aux moments critiques, nous a été précieuse.

Après nous avoir accepté au sein de l'Unité qu'il dirige, et dont il a bien voulu nous faire partager les responsabilités, il a été l'instigateur de ce travail qu'il a ensuite constamment suivi.

Qu'il soit assuré pour l'avenir de notre reconnaissance, de notre dévouement et de notre amitié.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ P. F. DENOIX,

Directeur de l'Institut Gustave Roussy,

Chirurgien des Hôpitaux de Paris,

Officier de la Légion d'Honneur.

Qui nous a fait l'honneur de nous accueillir à l'Institut Gustave Roussy et nous a permis de réaliser ce travail.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respectueux dévouement.

AUX LABORATOIRES CHOAY,

et plus particulièrement

A MONSIEUR M. THELY,

dont l'aide et les conseils nous ont été très utiles.

A MADEMOISELLE J. TRENTESAUX,
A MADEMOISELLE M. F. KERMARC,
A TOUS LES MEMBRES DES UNITÉS DE BIOLOGIE CLINIQUE ET DE BIOCHIMIE DE L'INSTITUT GUSTAVE ROUSSY,

pour l'aide précieuse et amicale qu'ils nous ont apportée.

PRINCIPALES ABRÉVIATION UTILISÉES AU COURS DE CE TRAVAIL

PR. DNA : Protéines associées à l'Acide désoxyribonucléique.
DNA : Acide désoxyribonucléique.
RNA : Acide ribonucléique.
DNase I : Désoxyribonucléase I.
P. ADN : Phosphore désoxyribonucléique.
EDTA : Acide éthylène diamine tétracétique.
ASP : Acide aspartique.
GLU : Acide glutamique.
GLY : Glycocolle.
ALA : Alanine.
VAL : Valine.
MET : Méthionine.
ILEU : Isoleucine.
LEU : Leucine.
PRO : Proline.
TYR : Tyrosine.
PHE : Phénylalanine.
ORN : Ornithine.
LYS : Lysine.
HIS : Histidine.
TRY : Tryptophane.
ARG : Arginine.
THR : Thréonine.
SER : Sérine.
CYS. AC. : Acide cystéique.
1/2 CYS : Cystéine.
D.O. : Densité optique.
DNP : Dinitrophényl dérivé.
Tris : Trishydroxyméthylaminométhane.
P.M. : Poids moléculaire.
PIE : Point Iso-Électrique.

INTRODUCTION

La vie dépend du fonctionnement coordonné d'un grand nombre de systèmes enzymatiques. La nature, la quantité et l'activité de ces enzymes doivent être réglées de façon à assurer aux cellules une adaptation au milieu dans lequel elles se trouvent placées. Cette nécessité suppose donc l'existence de mécanismes régulateurs de l'activité métabolique. D'autre part, lorsqu'il s'agit d'organismes pluricellulaires, les cellules toutes issues d'une même cellule originelle tendent à se différencier par leur aspect morphologique, leur rôle physiologique et leur capital enzymatique. Chaque cellule, bien que possédant tout l'ensemble de l'information génétique ne peut donc exprimer qu'une partie de ses potentialités. Cette expression cellulaire différenciée suppose, elle aussi, la présence d'un mécanisme régulateur qui réprime ou autorise des synthèses déterminées.

Il est maintenant communément admis que l'ensemble de l'information génétique est contenu dans la molécule d'acide désoxyribonucléique (DNA) (si l'on excepte certains virus ne contenant que de l'acide ribonucléique (RNA)). Mais cette macromolécule complexe se trouve généralement associée à d'autres substances qui sont :

— les acides ribonucléiques;
— certains métaux;
— des polysaccharides;
des protéines.

Étant donné le rôle biochimique très important du DNA, on peut se demander si cette association existe réellement « in vivo » en participant à l'activité biologique du DNA ou bien si au contraire ces substances ne sont que des impuretés qui ne sont pas éliminées au cours de l'extraction du DNA.

On a, à l'heure actuelle, plusieurs raisons de retenir la première hypothèse :

1. *Les acides ribonucléiques.*

Il existe en effet des molécules complexes, les hybrides DNA-RNA. Ces molécules constitueraient la première étape de la synthèse des protéines selon le schéma proposé par Jacob et Monod [97] : trans-

cription spécifique de la séquence nucléotidique du DNA sur les molécules complémentaires de RNA grâce à un enzyme, le RNA Polymérase ([83, 94, 189]) ...

2. *Les métaux.*

Le DNA possède des affinités importantes pour les ions métalliques et notamment pour les métaux bivalents ([188, 100]). Pour certains auteurs, les ions métalliques sont fixés sur les groupements phosphates du DNA, pour d'autres ils sont fixés plus spécialement sur les bases puriques, pour d'autres enfin, les deux sites interviennent. Certains auteurs ont montré la nécessité de la présence de cations bivalents pour la synthèse du DNA, d'autres émettent l'hypothèse que les métaux interviennent dans le déroulement des deux chaînes de DNA précédant la duplication. Kirby ([105, 104]) admet que les ions métalliques jouent un rôle important dans la liaison du DNA avec les protéines qui lui sont associées et qui ne sont pas éliminées au cours de son extraction. Enfin, l'étude « in vivo » de la fixation des ions métalliques sur le DNA a été entreprise notamment par Truhaut et coll. ([193]).

3. *Les polysaccharides et autres sucres.*

Si le sucre entrant classiquement dans la composition de la double chaîne du DNA est effectivement le 2 désoxy-D-ribose, quelques auteurs ont pu mettre en évidence la présence d'autres glucides dans les phages T_2T_4 et T_6 d'*E. Coli*. Il s'agit de glucose sous forme α et β ou du gentiobiose. Rappelons que ce sucre a été isolé pour la 1re fois à la Faculté de Pharmacie de Paris par Herissey. Ces sucres sont attachés par l'intermédiaire de la 5-hydroxy-méthylcyltosine et confèrent à ces DNA particuliers des propriétés antigéniques. D'autre part, chez les bactéries, des arguments théoriques ([95, 96]) et des observations directes au microscope électronique ([165]) ont permis la mise en évidence de points d'attache entre la membrane cytoplasmique d'une part et le noyau ou même le chromosome (donc le DNA) d'autre part. Or la membrane bactérienne est connue pour contenir des polysaccharides d'où une contamination du DNA par ces substances au cours de son extraction.

4. *Les protéines.*

Dans les cellules, en effet, le DNA est associé à des protéines et le rôle biologique joué par ces molécules est certainement très important.

a) *Les histones.*

Ces protéines basiques étroitement associées au DNA joueraient un rôle dans le mode d'expression génétique ([183, 184, 24, 93, 23, 3])... En effet, en se complexant au DNA, elles masqueraient certaines parties de cette macromolécule inhibant ainsi la synthèse du RNA-DNA dépendant et empêchant de cette manière la transcription de certaines informations génétiques.

Cette hypothèse est actuellement discutée car elle suppose des relations étroites entre la synthèse des histones et celle du DNA. Si on a effectivement remarqué que la synthèse du DNA s'accompagnait d'une augmentation de la production d'histones, que les histones étaient capables d'inhiber la synthèse du DNA ([19]), par action sur la DNA-polymérase, les travaux de Flamm et Birnstiel ([72]) ont montré par contre que l'inhibition de la replication du DNA n'avait que peu d'effets sur la synthèse des histones. D'autres hypothèses ont été proposées concernant le rôle biologique de ces histones : rôle structural purement passif tel que la protection contre l'action des enzymes par exemple ([35, 210]).

D'autre part, le fait que certaines histones contiennent des groupements méthyl et acétyl a conduit Allfrey et coll. ([2]) à faire jouer un rôle physiologique à ces radicaux. Ils ont montré qu'ils s'ajoutaient aux histones après la formation complète de la chaîne polypeptidique et que l'acétylation pourrait être un mécanisme physiologique intervenant dans la transcription du message génétique.

b) *Les protéines membranaires.*

Comme nous l'avons dit précédemment, il est probable que le DNA tout au moins chez les bactéries, soit « accroché » en un point de la membrane cellulaire d'où une contamination possible par les protéines qu'elle contient, et notamment par certains amino-acides particuliers comme l'acide αε-diaminopimélique.

c) *La DNA-polymérase.*

Ce système enzymatique découvert par Kornberg ([110]) assure la synthèse du DNA à partir de désoxyribonucléotides et en présence d'un DNA initial (le « DNA primer » des Anglo-Saxons). Cette synthèse nécessiterait l'intervention de deux protéines : la protéine de structure et la protéine initiatrice ([113]).

La protéine de structure : c'est une protéine particulière dont la synthèse, insensible au chloramphenicol ([113]), ne serait pas réglée par les mécanismes habituels. Pour Pritchard et Lark ([160]), cette protéine correspondrait à un point d'attache particulier reliant les deux extrémités du chromosome et lui assurant une structure circulaire. Pour Jacob et coll. ([96]) ce site structural correspondrait à une partie de la membrane cellulaire. Signalons, à ce propos que d'autres protéines particulières de la membrane cellulaire (les mucoprotéines) dont la synthèse est résistante au chloramphenicol sont décrites dans la littérature ([125]), Nous voyons également l'importance probable prise par la membrane cellulaire (bactérienne) dans la replication du DNA.

La protéine initiatrice : l'existence de cette protéine, dont la synthèse sensible au chloramphenicol est RNA-dépendante avait été postulée par Jacob et coll. ([96]). Selon Lark et Lark ([113]) cette protéine initiatrice commanderait la replication du DNA, la protéine de structure servant de point de départ, et se déplacerait le long du chromosome avec le point de replication. Elle est donc nécessairement située à la fourche, et serait peut être identique à la polymérase proprement dite.

Récemment, des formes duplicatives du DNA peut être identiques à la fourche elle-même ont pu être isolées par Paoletti et coll. ([149]). Billen, d'autre part ([18]) a pu mettre en évidence dans des extraits de cellules bactériennes des complexes entre la polymérase et le DNA.,

Ainsi se dégage l'intérêt qu'il y a de mieux connaître les substances qui accompagnent le DNA. Parmi celles-ci les protéines que ce soient les histones, les protéines membranaires ou la polymérase, semblent particulièrement intéressantes et c'est pourquoi nous avons entrepris une étude analytique de ces molécules.

Dans la suite de notre travail, ces protéines qui accompagnent le DNA après son extraction seront désignées par le symbole PR. DNA (protéines associées au DNA).

Les problèmes posés par cette étude peuvent se résumer de la façon suivante :

a) isolement et purification des PR.DNA;

b) analyse chimique de ces protéines et notamment détermination de la composition en amino-acides et constitution : peptide, polypeptide ou protéine proprement dite;

c) nature des PR.DNA selon leur concentration dans le DNA;

d) nature des PR.DNA selon la méthode d'extraction du DNA.

Pour essayer de résoudre ces problèmes, nous sommes partis d'échantillons de DNA préparés par différentes méthodes à partir du thymus de veau et contenant des taux variables de protéines. Ces méthodes de préparation sont résumés dans le chapitre III.

Ces échantillons de DNA ont été soumis à une double hydrolyse enzymatique (DNase I puis phosphodiestérase de venin de serpent) en vue d'éliminer au cours d'une dialyse ultérieure, une partie notable de désoxyribonucléotides formés. Le résidu de dialyse est alors concentré par évaporation rotative sous vide suivie d'une lyophilisation. Le lyophilisat est ensuite soumis à une hydrolyse chlorhydrique et les amino-acides constitutifs déterminés par chromatographie sur colonne.

Cette approche expérimentale et la composition en amino-acides des PR.DNA font l'objet du chapitre IV.

Dans le chapitre V sont reportés les résultats des électrophorèses entreprises sur le lyophilisat précédent, afin d'établir le degré d'hétérogénéité des PR.DNA.

Le fractionnement chromatographique de ces PR.DNA et l'analyse des fractions obtenues sont détaillés dans le chapitre VI.

Toutefois, la dernière partie de ce travail ne doit être considérée que comme préliminaire. Il serait intéressant, à notre avis, de continuer et de compléter ce travail aussi bien sur le plan analytique que sur le plan biologique.

Un chapitre d'introduction (chapitre I) a été consacré à une étude bibliographique résumée des désoxyrinucléoprotéines et des contaminants protéiques déjà étudiés dans la littérature.

Quant aux différentes techniques que nous avons utilisées, elles sont présentées dans le chapitre II.

CHAPITRE I

LES DÉSOXYRIBONUCLÉOPROTÉINES

Dans la matière vivante, les acides nucléiques ne sont généralement pas libres mais présents sous forme de nucléoprotéines. Ces nucléoprotéines donnent par dissociation, une fraction non protéinique (les acides nucléiques) et une fraction holoprotéinique, en particulier protamines ou histones.

Avant d'étudier la fraction de ces protéines qui reste intimement liée au DNA au cours de son extraction chimique, il nous a semblé utile de passer en revue la composition et la structure des désoxyribonucléoprotéines considérées à l'heure actuelle comme le principal composant des chromosomes.

I. — LES CONSTITUANTS DES DÉSOXYRIBONUCLÉOPROTÉINES.

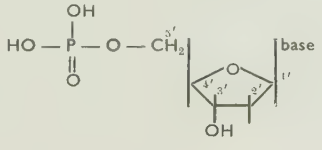
A. L'acide désoxyribonucléique (DNA).

Dans ce travail, nous considérons le DNA comme étant le support du matériel protéique analysé; c'est pourquoi nous nous bornerons à rappeler brièvement sa structure, nécessaire à la compréhension des structures possibles des nucléoprotéines.

Le DNA est un polymère constitué par l'association de très nombreux monomères : les nucléotides.

Chaque nucléotide correspond à l'association :

base-désoxyribose-acide phosphorique.



Quatre bases différentes entrent dans la composition des nucléotides, deux sont dérivés du noyau purique (adénine et guanine) et deux du noyau pyrimidique (cytosine et thymine). Il existe également d'autres bases qui ne sont pas présentes de façon habituelle dans les DNA. Ce sont :

— la 6 méthyladénine présente dans le DNA de *E. Coli* et de certains de ces phages;

— la 5 méthylcytosine rencontrée dans les DNA de mammifères, de poissons, d'insectes et de végétaux;

— le 5 hydroxyméthylcytosine rencontrée dans certains bactériophages d'*E. Coli*.

Enfin l'uracile et le 5-hydroxyméthyluracile présents dans certains bactériophages de Bacillus subtilis.

Ces nucléotides sont reliés entre eux par des liaisons phosphodiesters contractées entre une molécule d'acide phosphorique et les deux hydroxyles en 3′ et 5′ du désoxyribose de deux nucléotides voisins.

La structure secondaire de la molécule de DNA a été élucidée à la suite d'études par diffraction des rayons X, notamment par Watson et Crick ([206]). Rappelons que cette molécule est constituée de deux chaînes polynucléotidiques enroulées en hélice autour d'un axe. Ces deux hélices étant de polarité opposée, les groupements phosphates sont situés à l'extérieur et les bases à l'intérieur. Ces bases sont appariés entre elles par des liaisons hydrogènes,

— d'une part entre adénine et thymine (deux liaisons);

— d'autre part entre guanine et cytosine (trois liaisons).

La proportion des bases du DNA est constante pour les différentes cellules d'un individu, ceci pour une même espèce. Mais cette proportion varie d'une espèce à l'autre.

B. Les protéines nucléaires (*).

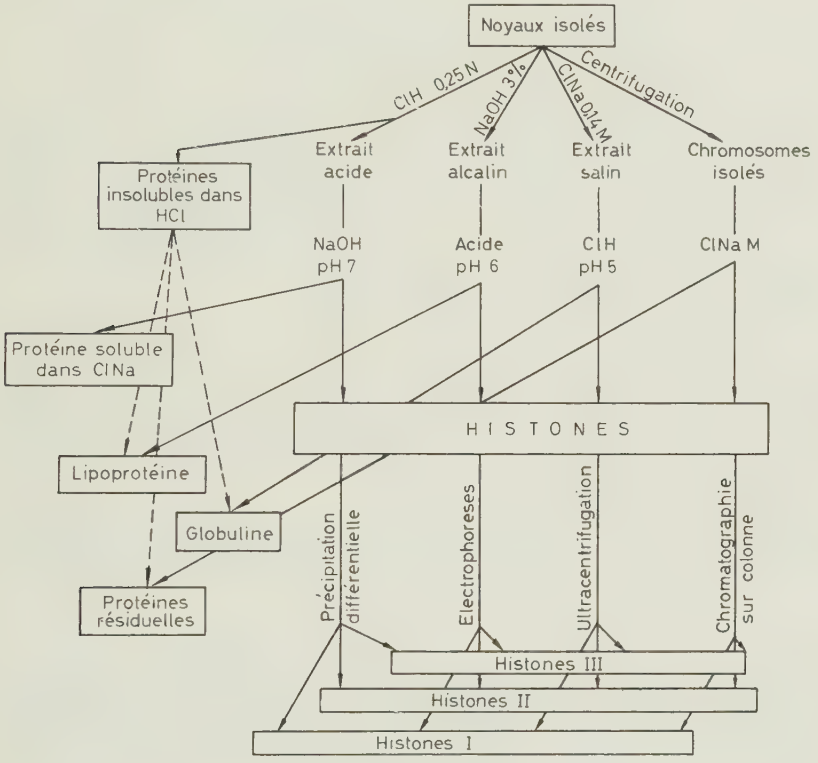
Les acides nucléiques préparés au laboratoire sont généralement obtenus sous la forme de sels avec des ions Na^+ qui neutralisent les charges négatives des groupements phosphates. Cependant, dans l'organisme, les acides nucléiques sont associés à des protéines et seulement 1/30^e ou moins des groupements phosphates sont neutralisés par des cations métalliques ([70]). Il nous faut également signaler que les DNA des bactériophages T de *Escherichia Coli* peuvent être associés à des polyamines ([5]). Ces protéines associées au DNA peuvent être classées en protamines, histones et « protéines résiduelles » ([134, 184, 85, 34, 37, 4]). Certains auteurs ont également signalé la présence d'une globuline et d'une lipoprotéine ([34, 85]).

Leur extraction à partir des noyaux isolés peut être résumée par le tableau suivant (tableau 1).

(*) Il est conseillé de se reporter au livre de Busch ([33]).

TABLEAU 1

ISOLEMENT DES DIFFÉRENTES PROTÉINES NUCLÉAIRES SELON BUSCH ET DAVIS [34].



1. *Les protamines* [67].

Ce sont des protéines basiques très particulières puisqu'on ne les trouve qu'associées au DNA des spermatozoïdes. Leur répartition est assez générale puisqu'on les trouve aussi bien chez les poissons [111] que chez les oiseaux [54] et chez les mammifères [202].

Présentes uniquement dans les spermatozoïdes matures, elles sont extraites par SO_4H_2 à 1 % et précipitées par l'alcool à partir de cet extrait. De faible poids moléculaire, elles ne contiennent que quelques aminoacides et sont particulièrement riches en arginine. Elles sont par contre dépourvues de tryptophane, de phénylalanine et d'acides aminés soufrés. FELIX et coll. [67] ont montré que la composition en aminoacides de ces protéines est caractéristique pour chaque espèce de poisson.

Les protamines ne sont pas homogènes mais constituées par un mélange de nombreux composants voisins. Si l'électrophorèse sur papier ne révèle que deux fractions [162], l'utilisation d'un support liquide (méthode de TISELIUS) permet de mettre en évidence un nombre plus

important de fractions, en particulier chaque protamine peut être ainsi résolue en deux fractions principales de poids moléculaire différent, chacune de ces fractions étant elle-même hétérogène ([214]). Le groupement aminé terminal est toujours identique, quelle que soit la protamine, et a été identifié à la proline ([203, 196]).

2. *Les histones* ([151]).

On désigne généralement sous ce nom les protéines basiques autres que les protamines, présentes dans le noyau cellulaire des différents organes. Ces protéines sont étroitement associées au DNA dans l'organisme, c'est pourquoi nous insisterons plus particulièrement sur leur analyse. Cette définition doit cependant être étendue car des protéines basiques à caractères d'histones ont été retrouvées dans le cytoplasme, associées à des acides ribonucléiques ([48, 36]).

a) *Préparation.*

Les histones sont généralement préparées par extraction acide des noyaux ou des nucléoprotéines avec ClH 0,1 N à 0,3 N ([10, 108, 167]), l'extrait est ensuite dialysé et lyophilisé. Un autre procédé consiste à précipiter les histones à partir de cet extrait acide, par addition de NH_4OH jusqu'à pH 10 à 11.

Ces histones peuvent être dégradées au cours de leur préparation; en effet Phillips et Johns ont montré que certains tissus contiennent une une protéinase partiellement extractible par ClH 0,25 N ([154]).

b) *Fractionnement des histones.*

Les histones totales ainsi extraites sont considérées comme un mélange hétérogène de protéines. Classiquement elles sont séparées en 3 fractions, elles-mêmes probablement hétérogènes et les différenres nomenclatures adoptées dans la littérature sont mentionnées dans le tableau 2.

TABLEAU 2

Nomenclature des fractions d'histones selon Phillips ([151]).

Rapport $\frac{\text{Lysine}}{\text{Arginine}}$	Dénomination	Nomenclature ([47])	([49]) ([50])	([123])	([98a])	([98b])
$R < 1$	riches en arginine		β	III.IV	f_3	E_3
$1 < R < 4$	moyennement riches en lysine	B	γ	II	f_2	E_1
$R > 4$	très riches en lysine	A	α	I	f_1	E_2

Ces différentes fractions ont été obtenues par plusieurs méthodes :

— précipitation fractionnée, par l'acide trichloracétique à différentes concentrations par exemple;

— extraction différentielle par des solutions acides ou des sels neutres. Les histones riches en lysine sont les plus facilement extraites;

— migration électrophorétique sur papier ou sur gel d'amidon; les histones étant des protéines nettement basiques migrent en général dans un tampon acide et Davison et coll. [60] considèrent les diagrammes obtenus à des pH supérieurs à 4,5 comme étant de valeur limitée;

— enfin chromatographie sur divers supports (Amberlite, Carboxy méthyl cellulose ou alumine).

c) *Propriétés des histones.*

Les histones ont la propriété de former des aggrégats, spécialement les histones riches en arginine, et moyennement riches en lysine. Cet effet s'accroît avec le pH, la température, la force ionique, la concentration en protéines de la solution. Ces phénomènes d'aggrégation ont été mis en évidence notamment par ultracentrifugation [17, 194, 195]. On peut obtenir la désaggrégation de ces protéines par dialyse à une force ionique basse [194] ou par addition d'urée 4 M ou de chlorure de guanidium 2 à 3 M [122].

Les spectres d'absorption ultraviolette des histones sont voisins de ceux de la tyrosine [50] et variables suivant la teneur respective des différentes fractions en cet amino acide [195].

d) *Composition en amino-acides.*

Elle est rassemblée dans le tableau 3, dont les valeurs sont portées sur les figures 1, 2, 3 et 4. Nous avons reproduit les résultats obtenus à partir du thymus de veau puisque nous avons utilisé cet organe dans notre travail. Les résultats sont exprimés en moles pour 100 moles d'amino-acides. Toutefois l'analyse de quelques amino-acides d'histones totales de différentes espèces animales laissent supposer, étant donné la similitude des résultats, que ces histones comprennent un mélange semblable de composants malgré la diversité des origines [197, 109, 198, 200, 201]. Sur toutes les figures qui indiquent la composition en amino-acides d'une protéine, nous avons fait figurer comme élément de comparaison la composition en amino-acides d'une protéine normale d'*E. Coli.* Nous avons choisi cette protéine car elle contient tous les amino-acides courants, elle correspond à la composition moyenne en aminoacides d'un organisme total et peut ainsi servir de référence de base, *E. Coli* étant utilisé dans la plupart des laboratoires de Biologie Moléculaire. Nous avons écarté les histones par exemple car : d'une part il en existe plusieurs types et d'autre part elles ne contiennent pas tous les amino-acides.

Nous remarquons l'absence complète de tryptophane et les très faibles quantités d'amino-acides soufrés. Récemment, Murray [144] a pu mettre en évidence, dans des fractions chromatographiques d'his-

tones de différentes origines, la présence d'un amino-acide rarement rencontré dans les hydrolysats de protéines : la ε-N méthyl lysine.

TABLEAU 3

Composition en amino acides de diverses histones de thymus de veau.

Les résultats sont exprimés en moles pour 100 moles analysées.

Histones	Totale	Très riche en lysine	Moyennement riche en lysine	Riche en arginine
préparation	(47)	électrophorèse en gel d'amidon (98b)	chromatographie sur CMC (98a)	chromatographie sur CMC (98a)
ASP	4,8	3,5	14,3	16,9
GLU	8,2	5,6		
GLY	8,3	6,8	10,3	6,6
ALA	13,4	20,5	11,1	13,0
VAL	6,2	4,8	7,5	5,2
LEU	7,7	7,2	12,7	13,8
ILEU	4,3			
PHE	2,2	0,9	1,5	2,9
TYR	2,5	1,2	2,7	0,5
SER	5,9	6,6	5,2	4,4
THR	5,7	6,0	5,4	6,2
PRO	4,9	8,1	3,6	4,9
MET	1,0	—	—	—
1/2 CYS	0,1	—	—	—
ARG	8,3	4,1	9,8	13,2
HIS	2,0	1,5	2,7	2,2
LYS	14,7	23,1	13,1	10,3
LYS/ARG	1,77	5,7	1,34	0,78
Figures correspondantes.	1	2	3	4

e) *Le précipité neutre.*

C'est le nom donné par Davison (58) aux protéines qui précipitent à partir d'extraits acides de noyaux, par dialyse à un pH voisin de 6,5. L'importance de ce précipité est variable suivant l'organe ayant servi à préparer les histones. Pour le thymus de veau, il représente 1 à 2 % des histones totales. Ce précipité fournit par chromatographie deux fractions principales :

- une fraction non basique $\left(\frac{\text{acides aminés basiques}}{\text{acides aminés acides}} = 0{,}4\right)$;

— une fraction basique $\left(\frac{\text{acides aminés basiques}}{\text{acides aminés acides}} = 1{,}3\right)$, constituée par des histones impures et représentant 70 % du total ([58]).

Ce précipité a été retrouvé par Leroy Kuehl ([116]) à partir de noyaux d'érythrocytes de poulet et a fourni également plusieurs fractions par chromatographie sur phospho-cellulose.

3. *Les protéines résiduelles.*

Ce sont les protéines nucléaires de caractère acide. Plusieurs auteurs, depuis quelques années, ont identifié, dans le noyau des protéines n'ayant pas un caractère basique.

Stedman et coll. ([181]) isolent en 1943 une telle protéine qu'ils appellent « chromosomin ». Puis en 1946 Mirsky et Pollister isolent, associée au DNA une protéine contenant du tryptophane qu'ils appellent « Tr Pr » ([128]). Mirsky et Ris séparent ensuite des « residual chromosoms » ([130]) identiques à la « Tr Pr » précédente. D'autres auteurs

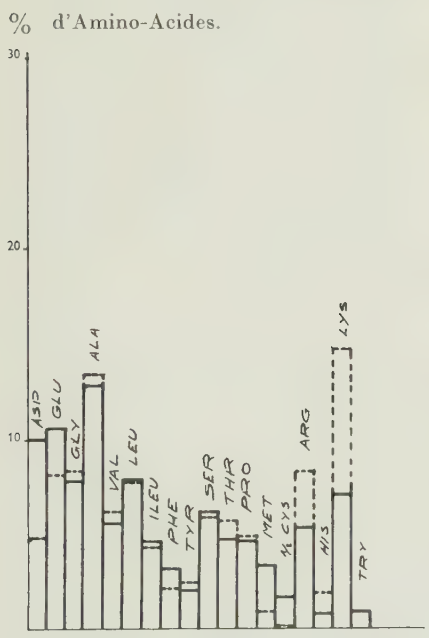


Fig. 1. — Composition en Amino-Acides (riche en Lys, Arg, pauvre en Asp, Glu, Met, 1/2 Cys.) d'une histone totale (- - -) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) (Morowitz 140) Histone extraite de thymus de veau (47).

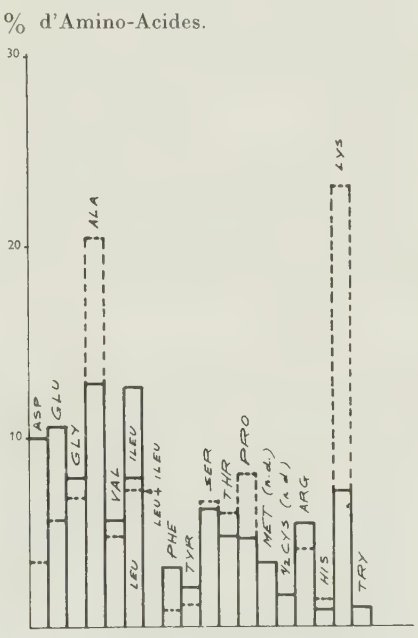


Fig. 2. — Composition en Amino-Acides (riche en Lys, Ala; pauvre en Asp, Glu, Leu + Ileu) d'une histone très riche en Lysine (- - -) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) (Morowitz 140). Histone extraite de thymus de veau (98 *b*).
n.d. : Amino-Acides non déterminé.

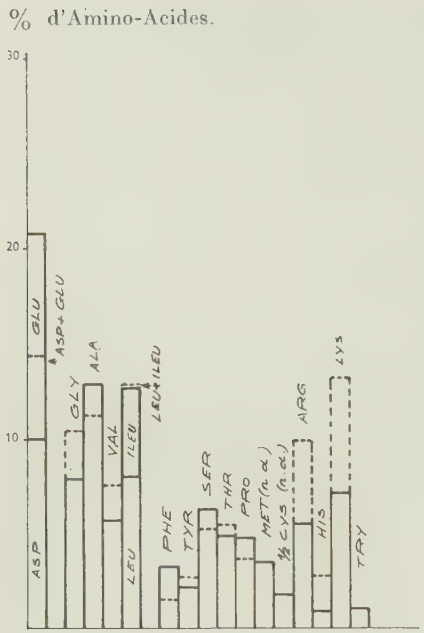


Fig. 3. — Composition en Amino-Acides (riche en Arg, Lys; pauvre en Asp, + Glu.)d'une histone moyennement riche en Lysine (- - -) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) (Morowitz 140) Histone extraite de thymus de veau (98 *a*).
n.d. : non déterminé.

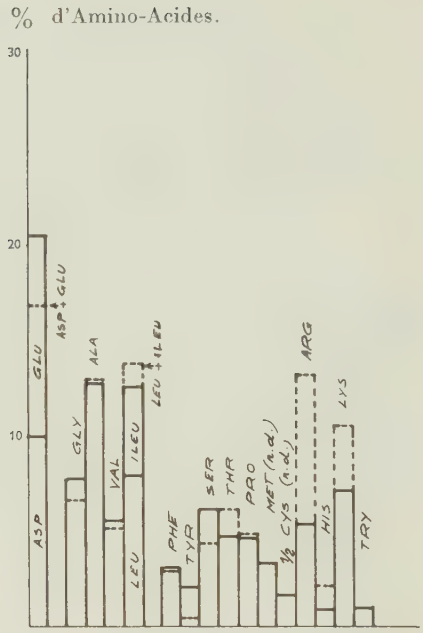


Fig. 4. — Composition en Amino-Acides (riche en Arg, Lys; pauvre en Asp + Glu.) d'une histone riche en Arg (- - -)comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) (Morowitz 140) Histone extraite de thymus de veau (98 *a*).
n.d. : non déterminé.

identifient également des protéines nucléaires de caractère acide ([86, 52, 204]). Il est probable, comme le suggèrent Butler et Davison ([37]) que toutes ces protéines sont, sinon identiques, du moins très voisines et ont comme origine une seule et même protéine.

Ces protéines contiennent du tryptophane et une quantité non négligeable de RNA, variable d'ailleurs avec le tissu de départ. Dans toutes les protéines résiduelles analysées, il y avait plus de glycine que de sérine et plus d'arginine que de lysine (les protéines cytoplasmiques ont ces rapports inversés). Il a été démontré que ces protéines sont essentielles, au même titre que le DNA, pour assurer l'intégrité morphologique des chromosomes ([132]) : si la protéine résiduelle d'une suspension de chromsomes dépourvue d'histones est désintégrée par la trypsine, le DNA est libéré et aucune structure chromosomique ne peut alors être détectée au microscope.

Les quantités relatives de DNA et de protéines résiduelles varient considérablement suivant le tissu dont on est parti. En particulier la quantité des protéines résiduelles varie en fonction de l'activité métabolique du cytoplasme de la cellule ([53, 131]). Dans le thymus de veau,

cette protéine représente 8 % environ des protéines totales présentes dans les nucléoprotéines ([60]) alors que ce taux augmente d'une façon importante dans les tissus tumoraux ([182]) ou les tissus en régénération.

La composition en amino-acides de ces protéines a été déterminée et quelques exemples en sont donnés dans le tableau 4 dont les valeurs sont portées sur les figures 5, 6 et 7.

TABLEAU 4

Composition en amino acides de quelques protéines résiduelles étroitement associées au DNA.

Origine	Foie de rat ([185])	Ascite d'Ehrlich ([185])	Pancréas de bœuf ([108])
Expression	Moles pour 100 moles analysées		
ASP	6,8	8,7	10,4
GLU	9,6	11,7	15,8
GLY	24,8	11,5	6,8
ALA	9,2	7,7	8,4
VAL	3,9	6,5	9,4
LEU	5,2	9,9	16,0
ILEU	2,7	5,1	
PHE	2,6	4,4	5,7
TYR	1,3	2,4	2,3
SER	5,6	7,6	4,3
THR	3,5	5,2	5,0
PRO	9,1	5,3	3,4
MET	0,9	1,4	—
1/2 CYS	0,3	—	traces
ARG	5,2	5,7	5,5
HIS	1,2	1,8	0,9
LYS	4,5	5,4	4,7
TRY	—	—	1,4
Figures correspondantes	5	6	7

4. *Autres fractions protéiniques.*

Il s'agit essentiellement d'une lipoprotéine et d'une globuline. Leur séparation des protéines résiduelles précédentes est d'ailleurs assez peu nette.

Mayer et Gulick ([127]) ont isolé, les premiers, une protéine nucléaire particulière, très riche en soufre. Des études ultérieures ont montré qu'il s'agissait d'une lipoprotéine ([42, 39]) et Engbring et Laskowski ([66]) indiquent qu'elle peut être rapprochée des protéines résiduelles précédemment analysées. Dallam ([51]) puis Wang et coll. ([204,

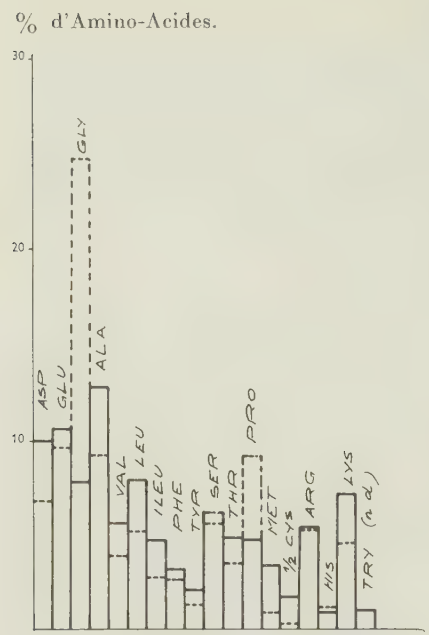


Fig. 5. — Composition en Amino-Acides (riche en Gly, Pro; pauvre en Met, 1/2 Cys, Ala, Lys.) d'une protéine Résiduelle de Foie de Rat (- - -) (185) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) (Morowitz 140).
n.d. : non déterminé.

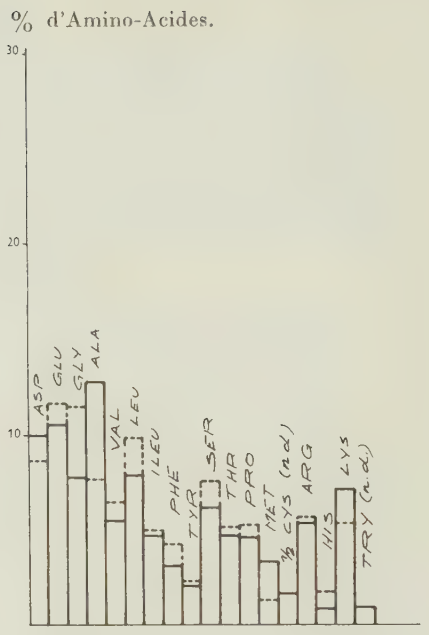


Fig. 6. — Composition en Amino-Acides (riche en Gly, pauvre en Ala, Met, Lys.) d'une protéine résiduelle d'Ascite d'Ehrlich (- - -) (185) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) (Morowitz 140).
n.d. : non déterminé.

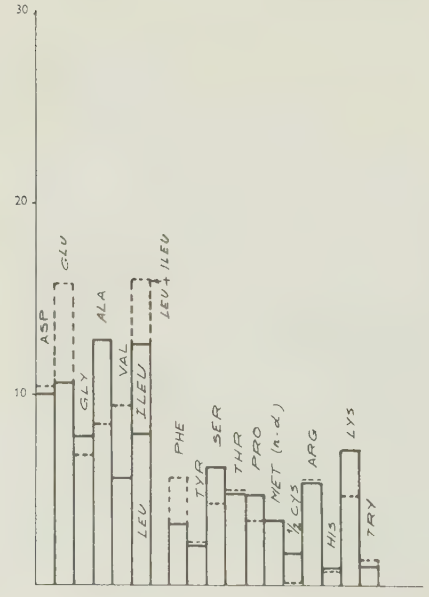


Fig. 7. — Composition en Amino-Acides (riche en Glu, Leu + Ileu, Phe; pauvre en Ala, Lys.) d'une protéine résiduelle de Pancréas de Bœuf (- - -) (108) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) (Morowitz 140).
n.d. : non déterminé.

[205]) ont montré que la partie lipidique était constituée essentiellement de cholestérol et de phospholipides; aucun résultat quantitatif n'est signalé pour la partie protidique, si l'on excepte la présence constante de tryptophane.

Quant à la fraction globulinique, elle fut identifiée par Kirkham et Thomas ([107]). Dallam ([51]) propose une classification des différentes protéines nucléaires de la manière suivante :

Fraction globulinique	60 %
Protéines basiques	22 %
Lipoprotéines	14 %
Protéines résiduelles	3 %

II. — STRUCTURE DES DÉSOXYRIBONUCLÉOPROTÉINES.

La structure des désoxyribonucléoprotéines est très importante. En effet, dans le noyau cellulaire et en particulier dans les chromosomes le DNA et les différentes protéines sont intimement liées et l'étude de leur mode de liaison permettra peut être d'élucider par quels mécanismes le DNA remplit ses fonctions génétiques.

Ces études ont été entreprises notamment par l'examen des schémas obtenus par diffraction aux rayons X ([70, 208, 209, 210, 211, 212]).

1. *Désoxyribonucléoprotamines.*

Les différentes études physico-chimiques entreprises suggèrent que les liaisons entre le DNA et les protamines sont de type électrostatique ([67, 1]). En effet les taux de P. ADN (électronégatif) et de groupements arginine (électropositif) sont à peu près égaux, avec une légère prédominance des charges électronégatives qui explique la légère solubilité dans l'eau et la combinaison possible avec des colorants chargés positivement ([1]). Feughelman et coll. ([70]) ont montré, par l'utilisation d'une chaîne poly L arginine synthétique que les résidus arginine étaient enroulés d'une façon hélicoïdale autour de l'espace le moins large séparant les deux chaînes désoxyribose-phosphate de la double hélice du DNA et attachés à cette double hélice par des liaisons électrostatiques par l'intermédiaire des groupements phosphates (fig. 8). D'un autre

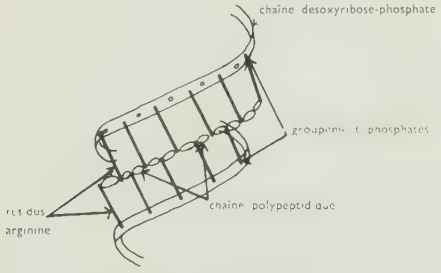


Fig. 8. — Liaisons DNA Protamine selon Wilkins ([208]).

côté les amino-acides non basiques peuvent être reliés aux bases constitutives du DNA soit par des liaisons de Van der Waals, soit par des liaisons hydrogènes. Cette structure proposée par Feughelman permet d'expliquer l'observation faite par Astbury et Bell (6) selon laquelle l'espace entre les nucléotides du DNA est égal à l'espace entre les amino acides d'une chaîne polypeptidique sous sa forme β.

2. *Désoxyribonucléohistones.*

Les désoxyribonucléohistones, au même titre que les désoxyribonucléoprotamines ne sont pas des artefacts de préparation et correspondent vraiment à une entité existant dans le noyau cellulaire intact. Elles ont fait l'objet de nombreux travaux; Bonner et Ts'o notamment leur ont consacré un très récent ouvrage (25). Le DNA dans les chromosomes de la plupart des organismes supérieurs est « complexé » avec une quantité approximativement égale d'histones (50). La séparation de ces deux composants en solution aqueuse nécessite des forces ioniques élevées indiquant l'existence de liaisons électrostatiques entre les acides aminés basiques de l'histone et les groupements PO_4 du DNA. Toutefois la somme des acides aminés basiques dans une nucléohistone est inférieure à la totalité des groupements phosphates électronégatifs et la différence serait due aux ions Na^+ (59). Cependant Vendrely et coll. (199) par l'analyse de DNP in situ ont montré que :

— dans les nucléohistones, les groupements phosphates du DNA sont complètement saturés par les acides aminés basiques;

— à l'extraction, la saturation n'est pas complète car une fraction protéique labile (probablement une histone riche en lysine) est perdue.

En se basant sur le fait que les acides aminés basiques, dans les histones totales, représentant environ 25 % des acides aminés totaux, Davison et Butler (59) ont proposé une structure des nucléohistones représentée sur la figure 9.

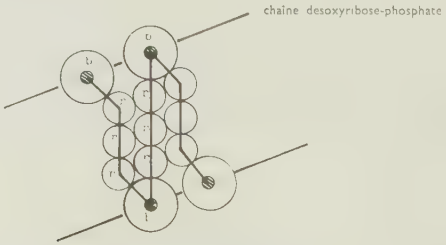


Fig. 9. — Schéma d'une nucléohistone selon Davison et Butler (59).

= PO_4.
b = acide aminé basique.
r = acide aminé non basique.

Mais cette structure ne peut pas être retenue car il a été démontré (155, 153) que les acides aminés basiques sont disposés irrégulièrement le long de la molécule d'histone.

Des études de dispersion optique indiquent que les 2/3 de l'histone sont sous forme d'une hélice α ([217, 30]). Donc, en solution aqueuse, il a été proposé que la plus grande partie de l'histone se trouve liée, sous forme d'une hélice α discontinue, à la double hélice du DNA à l'endroit du plus grand espace séparant les deux chaînes désoxyribose phosphate ([217]) (fig. 10).

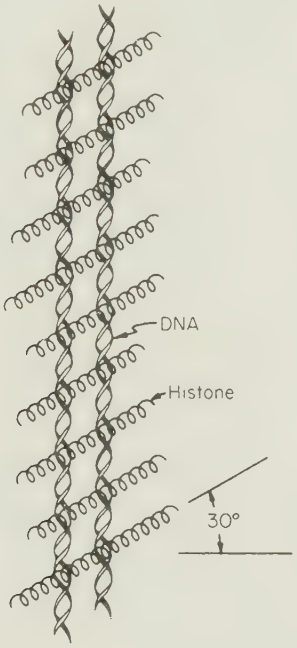


Fig. 10. — Structure des nucléohistones en solution selon Zubay et Doty ([217]).

Dans le chromosome, il est vraisemblable que des segments adjacents de la double hélice d'une molécule de DNA sont liés ensemble par des molécules d'histones sous forme d'une hélice α (fig. 11).

Cette structure, cependant, suppose elle-même une distribution régulière des amino-acides basiques pour neutraliser les groupements phosphates du DNA. Il est également nécessaire que la molécule d'histone sous sa forme α contienne un nombre suffisant d'ouvertures régulièrement espacées pour que la protéine puisse s'enrouler autour d'une seule molécule de DNA. De telles ouvertures peuvent se présenter soit par l'inclusion de proline soit par des groupements d'amino-acides non disposés sous la forme d'une hélice α.

Ces objections sont levées si on considère que la nucléohistone consiste en plusieurs molécules de DNA jointes ensemble par la protéine basique ([211, 212, 124]). Cette deuxième hypothèse, plus vraisemblable puisqu'elle est en accord avec la distribution irrégulière des amino-acides basiques le long de la molécule d'histone, n'a cependant pas été

confirmée. La caractérisation des liaisons chimiques entre le DNA et les protéines est sérieusement entravée par la grand nombre de groupements fonctionnels de l'acide nucléique et de la protéine. C'est pourquoi Monty et Dounce [134] ont entrepris une dégradation systématique de la nucléoprotéine par des enzymes protéolytiques afin d'obtenir des molé-

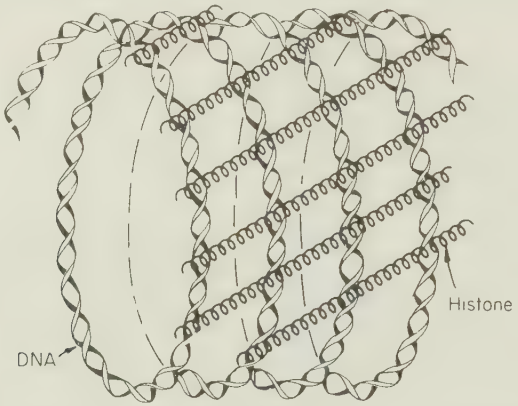


Fig. 11. — Structure des nucléohistones « in vivo » selon Zubay [216].

cules plus petites, de poids moléculaire raisonnable. Ils ont pu préciser de cette manière que les protéines ne restent attachées que sur 2 % seulement des nucléotides totaux. Cela signifie qu'il doit y avoir une liaison protéine-DNA tous les 50 nucléotides environ. Quant aux protéines résiduelles, peu de choses sont connues sur leur liaison avec le DNA. On sait seulement qu'elles sont indispensables à l'intégrité morphologique des chromosomes (p. 12).

III. — LES NUCLÉOTIDES PEPTIDES.

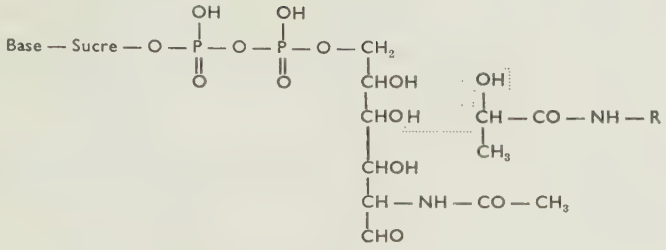
Depuis quelques années un assez grand nombre de molécules composées de nucléotides et de peptides ou d'amino-acides, a été décrit dans la littérature; mais il s'agit généralement de ribonucléotides peptides, attaquables par la ribonucléase, d'origine cytoplasmique, jouant un rôle dans la biosynthèse des protéines. Ces composés ont une origine variable : levures [90, 79, 57], foie de rat [148], foie de souris [84, 102], foie de bœuf [207] et tissus tumoraux tels que les cellules d'ascites [57, 84].

D'après Wilken et Hansen [207] la plupart de ces composés peuvent se ranger dans une des quatre classes suivantes :

1) nucléotides peptides de type amide (isolés par exemple des staphylococcus aureus traités par la pénicilline), de constitution :

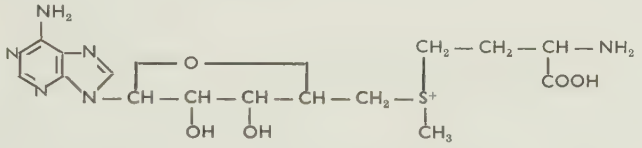
U.D.P. —(Liaison ester)→ N acétyl glucosamine —(Liaison éther)→ acide lactique —(Liaison amide)→ peptide

répondant à la formule :

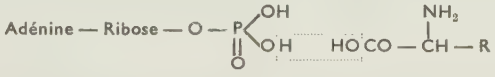


Ces composés joueraient un rôle dans la synthèse de la membrane bactérienne.

2) Liaison entre un amino-acide soufré et le 5′-désoxyadénosine. Le type en est la S-adénosylméthionine, très important donateur de groupements méthyl :

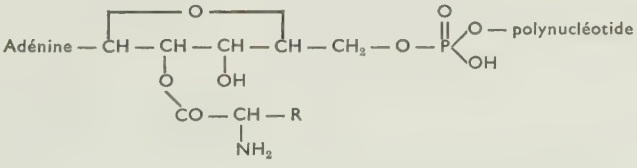


3) Liaison anhydride entre le COOH d'un amino-acide et l'acide phosphorique de l'acide adénylique qui provient lui-même de la décomposition de l'ATP en AMP + PP.



Ces composés provoquent l'activation des acides aminés nécessaires à la biosynthèse des protéines.

4) Liaison ester entre un amino-acide et le ribose du nucléotide terminal d'un RNA soluble (l'acide aldénylique).



L'amino-acide, précédemment activé par sa combinaison avec l'acide adénylique vient se fixer par cette liaison ester sur le *s*-RNA. Rappelons à ce propos que, si chaque amino-acide possède un *s*-RNA qui lui est propre, une partie de la molécule semble avoir une composition commune : toutes les molécules de *s*-RNA semblent commencer par un acide guanylique et se terminer par le triplet-cytidylique-adénylique (CCA).

Ces composés sont des intermédiaires dans la biosynthèse des protéines. Ils sont attachés, au moment de la synthèse, à des structures cellulaires spécialisées, les ribosomes, par l'intermédiaire du *m*-RNA. Toutefois, certains nucléotides-peptides décrits dans la littérature ne peuvent pas se classer dans l'un des quatre groupes précédents. Par exemple dans un des cas signalés ([207]) :

— la nature de la liaison peptide-nucléotide est différente (liaison ester avec le groupement phosphate du nucléotide) de celle d'un dérivé *s*-RNA-acide aminé par exemple;

— certains des amino-acides constitutifs du peptide ne sont pas des constituants classiques des protéines. Ce sont la taurine, la β-alanine et l'acide cystéique.

IV. — LES CONTAMINANTS PROTÉIQUES EXTRAITS AVEC LE DNA.

Nous avons voulu, dans ce paragraphe, rassembler les différents résultats mentionnés dans la littérature concernant la composition et éventuellement la structure des contaminants protéiques intimement liés au DNA et qui sont entraînés avec lui au cours de sa préparation. Il était en effet très important pour nous d'effectuer cette analyse et nous aurons l'occasion au cours des chapitres consacrés aux expérimentations, de confronter nos résultats avec ceux déjà publiés; nous pourrons constater parfois des différences importantes probablement dues à la méthode particulière utilisée pour extraire et analyser ces protéines.

A. Composition en amino-acides.

La composition en amino-acides des contaminants protéiques a été déterminée en utilisant des DNA d'origine très diverses :

— DNA bactérien, provenant de *Escherichia Coli* ([147, 11]);
— DNA de sperme de mammifères ([27]);
— DNA de thymus de veau, d'érythrocytes de poulet ([40, 41, 38]);
— enfin DNA provenant de leucocytes humains ([16]).

Dans tous ces exemples, les amino-acides ont été déterminés soit par chromatographie sur papier, soit par chromatographie sur colonne après hydrolyse chlorhydrique directe d'un échantillon de DNA. Les résultats obtenus sont rassemblés sur le tableau 5 dont les valeurs sont portées sur les figures 12 à 19.

On constate que les résultats obtenus par Champagne et coll. ([41]) se distinguent des autres (fig. 15, 16, 17). Ces auteurs trouvent en effet une prédominance des acides aminés basiques, notamment de la lysine, comme s'il s'agissait de fragments d'histones. Ils constatent d'autre part

Les résultats sont exprimés en moles pour 100 moles analysées.

Origine	Leucocytes humains [16]	Thymus de veau [38]	Thymus de veau [41]			Sperme de taureau [27]	*Escherichia Coli* [11]	*Escherichia Coli* [147]
Préparation	DNA : méthode de Kay et coll. [101] hydrolyse 110° ClH 6N, formation de DNP dérivés et chromatographie sur papier	DNA : méthode de Kay et coll. [101] hydrolyse 110° ClH 6N. formation de DNP dérivés et chromatographie sur papier	DNA : méthode de Signer et Schwander [173] méthode de Kay et coll. [101] hydrolyse 110° ClH 5,7 N chromatographie sur colonne			DNA : méthode de Kay et coll. [101] hydrolyse 110° ClH 6N chromatographie sur colonne	DNA : méthode de Kirby [104] hydrolyse 110° ClH 6N chromatographie sur colonne	DNA : méthode de Marmur [126] hydrolyse 110° ClH 6N chromatographie sur colonne
Taux de Protéine	0,85 %	0,80 %	1,66 %	0,62 %	0,08 %			
ASP	10,5	12	3,6	6,8	10,2	11,2	12,9	10,0
GLU	16,1	11	2,3	11,3	9,2	13,2	12,2	24,8
ALA	8,1	10	15,3	13,7	+	6,1	7,8	
VAL	6,5	8		2,7		12,4	7,0	6,7
LEU	17,7	17		8,7	4,2	4,4	8,3	6,9
ILEU				6,2	1,6	2,0	5,0	7,4
PHE	7,3	4		+	+	traces	4,7	2,7
TYR	+	0		+	+	traces	5,2	1,6
SER	8,1	9	5,0	9,8	12,8	26,0	4,9	5,2
THR	5,6	4	3,5	4,8	3,1	8,2	4,7	4,1
PRO	3,2	11	13,1	5,3	5,6		3,5	traces
MET				+	+	3,7	2,2	1,1
ARG	8,9	7	4,6	6,8	8,7		8,4	5,0
HIS	2,4	6		8,4	15,4	2,7	3,0	4,8
LYS.....	5,6	5	52,6	15,5	29,2	9,9	10,2	14,4
Figures correspondantes.	12	13	14	15	16	17	18	19

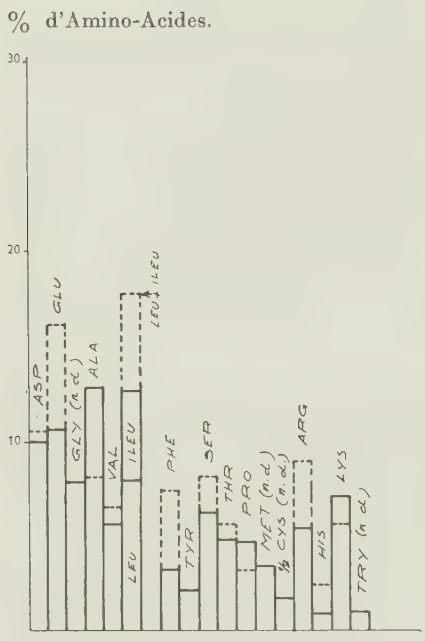


Fig. 12. — Composition en Amino-Acides (riche en Glu, Leu + Ileu, Phe, Ser, Arg, His, Tyr : présence (qualitatif) ; pauvre en Lys) d'un contaminant protéique d'un DNA de Leucocytes humains (- - -) (16) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) [Morowitz [140]].
n.d. Amino-Acides non déterminé.
Taux de protéines 0,85 %.

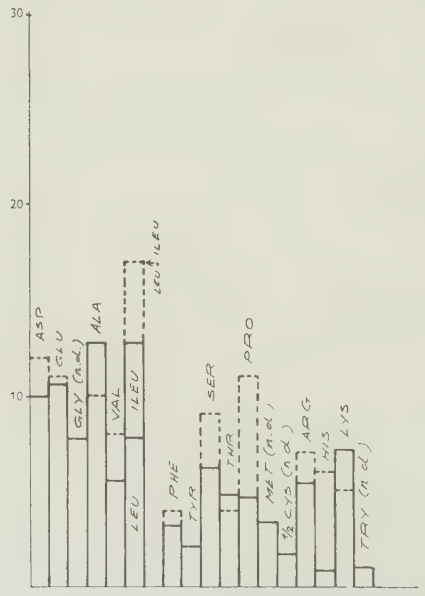


Fig. 13. — Composition en Amino-Acides (riche en Leu + Ileu, Ser, Pro, His; pauvre en Lys) d'un contaminant protéique d'un DNA de thymus de veau (- - -) (38) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) [(Morowitz [140])].
n.d. Amino-Acides non déterminé.
Taux de protéines 0,80 %.

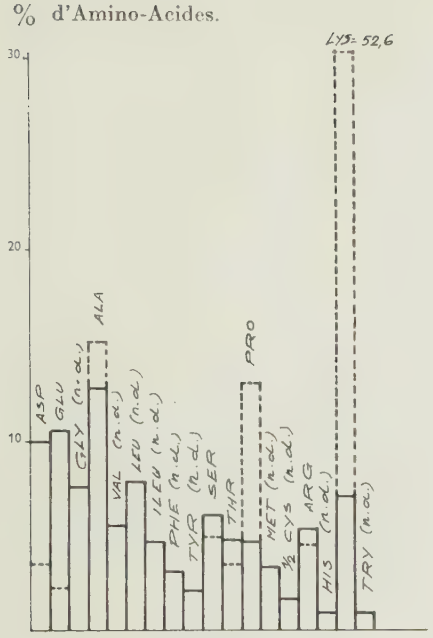


FIG. 14. — Composition en Amino-Acides (très riche en Lys; riche en Pro, Ala; pauvre en Asp, Glu) d'un contaminant protéique d'un DNA de thymus de veau (- - -) (41) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) [Morowitz [140]].
n.d. Amino-Acide non déterminé.
Taux de protéines : 1,66 %.

FIG. 15. — Composition en Amino-Acides (riche en Ser, His, Lys; Phe, Tyr, Met, présence [qualitatif]) d'un contaminant protéique d'un DNA de thymus de veau (- - -) (41) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) [Morowitz [140]].
n.d. Amino-Acide non déterminé.
Taux de protéines : 0,62 %.

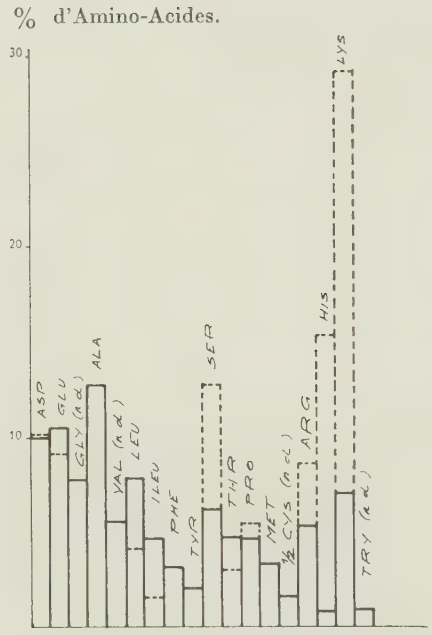


Fig. 16. — Composition en Amino-Acides (très riche en Lys, His, Ser; Ala, Phe, Tyr, Met, présence [qualitatif]; pauvre en Leu, Ileu) d'un contaminant protéique d'un DNA de thymus de veau (- - -) (41) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) [Morowitz (140)].
n.d. : non déterminé.
Taux de protéines : 0,08 %.

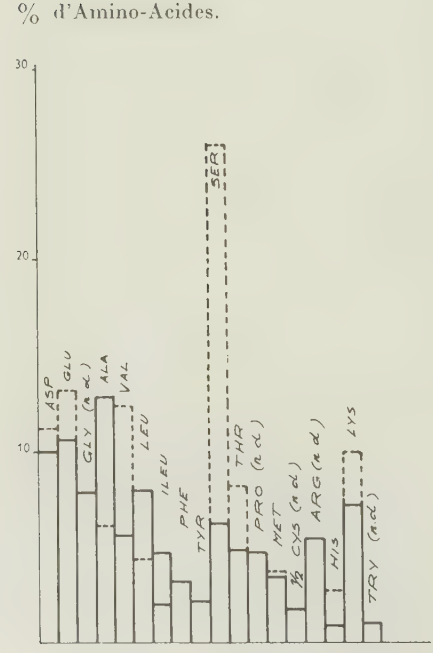


Fig. 17. — Composition en Amino-Acides (très riche en Ser; riche en Glu, Val, Thr, Lys, His; pauvre en Ala, Leu, Ileu; traces : Tyr et Phe) d'un contaminant protéique d'un DNA de Sperme de taureau (- - -) (27) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) [Morowitz (140)].
n.d. : non déterminé.

FIG. 18. — Composition en Amino-Acides (riche en Asp, Glu, Arg, Lys, Tyr, His; pauvre en Ala) d'un contaminant protéique d'un DNA de E. Coli (- - -) (11) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) [Morowitz (140)].
n.d. : non déterminé.

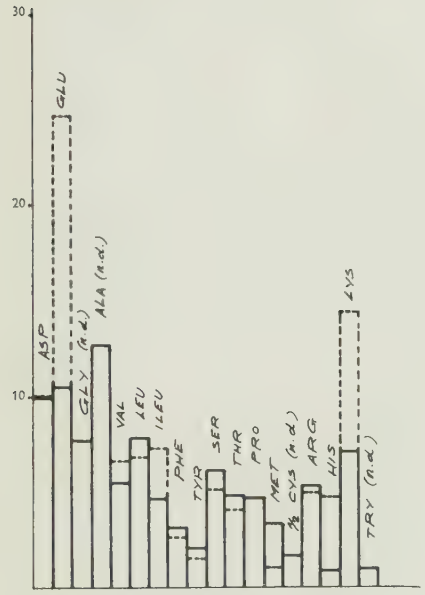


FIG. 19. — Composition en Amino-Acides (très riche en Glu, Lys, His; Pro : traces) d'un contaminant protéique d'un DNA de E. Coli (- - -) (147) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) [Morowitz (140)].
n.d. : non déterminé.

que le taux de lysine diminue d'une façon importante avec le taux des protéines totales contaminant l'échantillon de DNA; cette diminution s'accompagne d'une augmentation du taux de la serine, des acides aminés dicarboxyliques et de l'histidine. Les autres résultats par contre sont assez semblables malgré la diversité des origines et indiquent une prépondérance notable des acides aminés dicarboxyliques; quelques différences sont cependant enregistrées, particulièrement nettes au niveau de la proline, de la lysine (et de la serine en ce qui concerne les résultats obtenus par Borenfreund et coll. ([27])).

Si l'on compare ces résultats avec ceux du tableau 4 (page 13 : composition en amino-acides de quelques protéines résiduelles) on constate un assez grand parallélisme avec cependant un enrichissement marqué en acides aminés dicarboxyliques et en serine des contaminants protéiques du DNA. Cette richesse en amino-acides dicarboxyliques a également été signalé par Kirby ([104]). Les résultats obtenus par cet auteur montrent toutefois que les amino-acides retrouvés après hydrolyse chlorhydrique d'un échantillon de DNA sont variables avec la méthode de préparation du DNA.

Dans un travail récent, Dounce et Hilgartner ([65]) ont déterminé la composition en amino-acides de protéines résiduelles isolées des noyaux de foie de rat. Ils arrivent à des résultats à peu près identiques (notamment importance des acides aminés dicarboxyliques) malgré la méthode différente qu'ils ont utilisée : après élimination de la fraction globulinique, des histones et des lipides, ils traitent le résidu (qui contient le DNA et les protéines résiduelles) par CCl_3 COOH à 5 % 10 minutes à 95° pour éliminer le DNA. Le résidu insoluble est ensuite hydrolysé et les amino-acides déterminés par chromatographie sur colonne. Les résultats qu'ils obtiennent sont mentionnés dans le tableau 6 et la figure 20.

TABLEAU 6

Composition en amino acides des protéines résiduelles isolées de noyaux de foie de rat selon Dounce et Hilgartner ([65]).

Les résultats sont exprimés en amino-acides pour 100 g de protéine.

Amino acides	Pourcentage	Amino acides	Pourcentage
ASP	9,4	SER	5,3
GLU	14,8	THR	4,4
GLY	5,0	PRO	4,8
ALA	4,5	MET	1,0
VAL	6,0	1/2 CYS	0,5
LEU	8,8	ARG	8,2
ILEU	4,9	HIS	2,9
PHE	5,2	LYS	7,9
TYR	3,9		

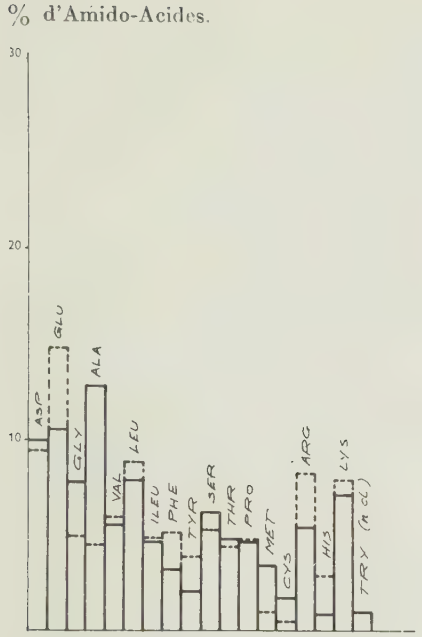


Fig. 20. — Composition en Amino-Acides (riche en Glu, Arg, His; pauvre en Gly, Ala.) des protéines résiduelles isolées de noyaux de Foie de Rat selon Dounce et Hilgartner [65] (- - -) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) (Morowitz 140). n.d. : amino-acide non déterminé.

B. Liaison de ces amino-acides avec le DNA.

Les résultats précédents laissent supposer que les contaminants protéiques constituent une fraction de protéines résiduelles. La nature de la liaison de ces contaminants avec le DNA a été étudié par Kirby [106, 105, 104] et également par Bendich [13]. Ce dernier en raison des résultats précédemment trouvés [27] considère que la serine joue un rôle prépondérant et est même incluse dans la chaîne désoxyribose-phosphate grâce à sa fonction alcool. Kirby, pour sa part, suppose que les acides aminés dicarboxyliques présents en forte proportion jouent un rôle considérable. Il admet que la liaison avec la molécule de DNA se fait par des liaisons d'électrovalence et de coordination grâce à l'intermédiaire d'un ion métallique (fig. 21).

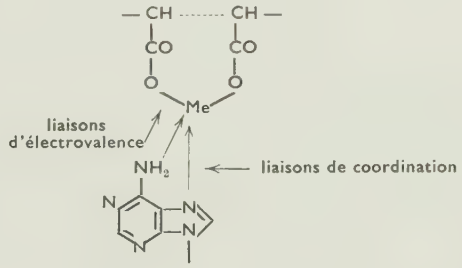


Fig. 21. — Liaison DNA-protéines selon Kirby [104].

Dans un travail récent, Lesko et coll. ([117]) arrivent à la conclusion que le matériel protéique doit être solidement lié aux nucléotides chargés négativement, peut-être par des liaisons de covalence.

La nature des amino-acides extraits avec le DNA commence donc à l'heure actuelle a être étudiée et les résultats obtenus par divers auteurs sont dans l'ensemble assez concordants. Mais par contre, on ne sait pratiquement rien sur l'enchaînement de ces amino-acides.

S'agit-il d'amino-acides libres liés séparément à la molécule de DNA, de plusieurs petits peptides ou d'une seule molécule, polypeptidique ou protéinique? Tout ce que l'on peut dire, c'est que les amino-acides retrouvés à l'analyse sont issus d'une protéine ou d'un polypeptide solidement attaché au DNA ([104]). Cette protéine ou ce polypeptide est lui-même issu probablement des protéines résiduelles étant donné sa composition en amino-acides. Un argument supplémentaire en faveur de cette hypothèse réside dans le fait que, au cours de l'analyse d'un DNA de sperme de Hareng, il a été trouvé : LYS, ASP, GLU et PHE ([104]), amino-acides normalement absents dans les protamines de même origine.

V. — CONCLUSION.

Pour nous résumer, nous avons rassemblé ci-dessous les principales caractéristiques concernant la composition des différentes protéines nucléaires.

1. *Les histones :*

— richesse en acides aminés basiques : arginine et lysine;
— pauvreté en acides aminés acides et en acides aminés soufrés;
— absence complète de tryptophane.

2. *Les protéines résiduelles :*

— richesse en glycine et relativement en acides aminés acides (surtout l'acide glutamique);
— pauvreté en acides aminés soufrés, en lysine, en alanine;
— présence de tryptophane.

3. *Protéines associées au DNA et extraites avec lui :*

— richesse en acides aminés acides (sauf toutefois pour certains des résultats obtenus par Champagne et coll.);
— richesse en histidine;
— richesse en sérine;
— pauvreté en acides aminés soufrés.

CHAPITRE II

TECHNIQUES UTILISÉES

Avant de présenter et de discuter les résultats expérimentaux que nous avons obtenus, ce chapitre va être consacré aux différentes techniques que nous avons utilisées au cours de ce travail. Trois, parmi celles-ci ont retenu notre attention et seront plus particulièrement détaillées : le dosage des protéines, la séparation des amino-acides par chromatographie sur colonne et le dosage simultané de l'azote et du phosphore par une méthode automatique que nous avons adaptée aux cas particuliers des acides nucléiques et de diverses fractions obtenues après chromatographie (voir chapitre VI).

I. — DOSAGE DES PROTÉINES.

Parmi les différentes analyses susceptibles d'être effectuées sur des solutions de DNA, le dosage des protéines nous intéressait d'une façon toute particulière.

Peu de méthodes sont décrites dans la littérature, permettant une évaluation quantitative des protéines et son adaptation au cas particulier que constitue le DNA.

1. La technique utilisant la réaction au Biuret ([78]).

Principe.

Une solution de protéines, additionnée de sulfate de cuivre et de soude, donne une coloration violette stable. Dans des conditions de concentration convenables, la densité optique est proportionnelle aux quantités de protéines introduites.

Cette coloration est due à la juxtaposition de plusieurs liaisons peptidiques : — NH — CO — CH — NH — CO —. Aussi la réaction n'est

R

pas rigoureusement spécifique des protéines et peut s'étendre aux polypeptides. Dans le cas présent, ce serait peut-être un avantage puisque nous ne connaissons pas, à priori, la nature exacte des PR.DNA (protéines ou polypeptides).

Néanmoins, nous n'avons pas retenu cette technique étant donné son manque de sensibilité. En effet, dans la majorité des cas, nous analysons des solutions contenant environ de 10 à 50 µg/ml de protéines, c'est-à-dire que nous sommes très loin des 2 à 6 mg nécessaires.

2. Technique polarographique ([15]).

Cette technique a été utilisée par Berg ([15]) pour la détermination des protéines dans des préparations de RNA et de DNA de diverses origines.

Elle fut utilisée ultérieurement par Ruttkay-Nedecky et Spanik pour doser les protéines du RNA du virus de la mosaïque du tabac ([164]).

Cette méthode de dosage soulève une difficulté particulière car elle ne peut être utilisée que si l'on dispose comme standard, d'une préparation pure de protéines absolument identiques à la protéine à doser; et surtout cette protéine, comme la protéine étalon, ne doivent pas être dénaturées; ou si elles le sont cette dénaturation doit être identique. Nous n'avons pas retenu cette méthode car :

— d'une part il serait difficile d'obtenir une protéine standard dans notre cas;

— d'autre part, nous ne sommes pas certains d'être seulement en présence de protéines (nous avions également à envisager le cas des peptides et d'amino-acides).

3. La technique colorimétrique de Lowry ([121]).

1. *Principe.*

Cette technique repose sur la détermination colorimétrique du complexe obtenu après réduction par les protéines en présence d'ions cuivriques du réactif phospho-tungsto-molybdique de Folin et Ciocalteu. Cette réduction est réalisée par élimination d'électrons à partir de la protéine, élimination probablement favorisée par formation d'un complexe quadrivalent entre l'ion cuivré et la protéine ([43]).

C'est cette technique que nous avons utilisée durant ce travail.

2. *Mode opératoire.*

a) *Préparation des réactifs* :

A :	Carbonate de sodium anhydre	2 g
	Tartrate de sodium et de potassium.....	0,02 g
	Soude 0,1 N q.s.p.	100 ml

Conservation à l'obscurité à + 4°.

B : Sulfate de cuivre 5 H_2O R.P. ..... 0,5 g
SO_4H_2 concentré R.P. ..... 1 goutte
H_2O distillée q.s.p. ..... 100 ml

C : Réactif A ..... 50 ml
Réactif B ..... 1 ml

Préparation extemporané. Conservation 24 heures.

D : Réactif de Folin et Ciocalteu
Dissoudre dans un ballon de 1 500 ml :
Tungstate de sodium ..... 100 g
Molybdate de sodium ..... 25 g
Eau distillée ..... 700 ml

Ajouter ensuite :

Acide phosphorique R.P. à 85 % ..... 50 ml
Acide chlorhydrique concentré R.P. ..... 100 ml

Porter 10 heures à l'ébullition douce avec un réfrigérant à reflux.

Ajouter ensuite :

Sulfate de lithium ..... 150 g
Eau distillée ..... 50 ml

Ajouter alors quelques gouttes de brome et porter 15 minutes à l'ébullition pour en chasser l'excès.

Refroidir et compléter à 1 000 ml.
Filtrer le réactif qui doit être jaune.
Conserver à l'abri de la lumière et à + 4°.

Ce réactif étant très long à préparer nous avons utilisé le réactif Merck que nous diluons extemporanément au 1/3 avec de l'eau distillée et qui nous a donné toute satisfaction.

b) *Technique* :

Mélanger dans un tube à essais :

Solution à doser : prise d'essai maximum ..... 1 ml
(cette solution contenant de 5 à 100 µg de protéines par ml)
H_2O distillée q.s.p. ..... 1 ml
Réactif C ..... 3 ml

Agiter. Attendre 10 minutes.

Réactif D ..... 0,3 ml

Agiter immédiatement.

Un tube témoin réactif est préparé parallèlement en remplaçant la solution à doser par 1 ml d'eau distillée.
La lecture est effectuée au spectrophotomètre au bout de 30 minutes contre le témoin.

Longueur d'onde ..... 750 mµ
Cuve ..... 10 mm

3. *Résultats obtenus.*

a) *Étalonnage.*

La solution la meilleure consisterait à prendre comme substance étalon, une PR.DNA, rigoureusement pure.

Ceci, comme nous l'avons discuté plus haut, est en fait irréalisable. Nous avons donc établi la courbe d'étalonnage en utilisant un sérum étalon (versatol) contenant 70 g/l de protéines, que nous avons dilué au 1/500e. La solution ainsi obtenue contient alors 140 µg de protéines par ml.

Établissement de la courbe.

Préparer les différentes concentrations en protéines comme il est indiqué ci-dessous (tableau 7).

TABLEAU 7

Préparation de la gamme étalon destinée au dosage des protéines par la technique de Lowry et coll. [121].

Protéines en réaction	7 µg	14 µg	28 µg	56 µg	84 µg	112 µg
Sérum étalon dilué	0,05 ml	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
H_2O distillée	0,95	0,9	0,8	0,6	0,4	0,2

Continuer le dosage comme indiqué précédemment.

b) *Sensibilité. Reproductibilité.*

Le tableau 8 reproduit les valeurs obtenues en répètant les dosages sur 3 dilutions d'un même sérum étalon.

TABLEAU 8

Reproductibilité de la technique de Lowry [121] effectuée sur 3 dilutions d'un sérum étalon (Versatol).

Quantité de Protéines dosées	Densité Optique		
	I	II	III
7 µg	0,038	0,043	0,041
14 µg	0,090	0,083	0,062
28 µg	0,125	0,140	0,130
56 µg	0,250	0,245	0,230
84 µg	0,350	0,375	0,345
112 µg	0,440	0,465	0,420

Ces valeurs sont reportés sur la figure 22.

Cette figure permet de mettre en évidence :

1) la reproductibilité médiocre d'une expérience sur l'autre ; les variations enregistrées sont de l'ordre de 10 % et imposent donc l'établissement d'une nouvelle gamme étalon pour chaque série de dosage ;

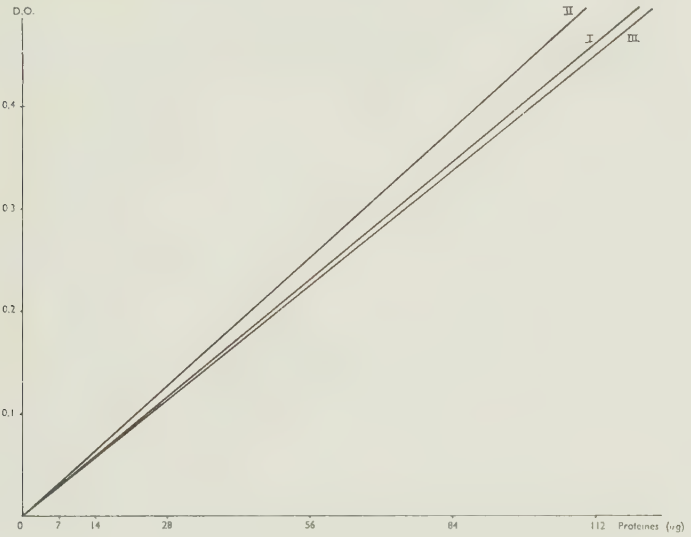


Fig. 22. — Reproductibilité de la technique de Lowry sur 3 dilutions (I, II et III) d'un sérum étalon.

2) une sensibilité qui, quoique très satisfaisante, ne permet pas d'apprécier avec précision des quantités inférieures à 10 µg.

Il est donc nécessaire pour déterminer avec le maximum de précision une faible quantité de protéines, de partir de solutions renfermant d'assez fortes quantités de DNA. Mais nous sommes limités par la grande viscosité des solutions de DNA très concentrées. En pratique, nous avons utilisé des solutions renfermant de 1 à 4 mg de DNA/ml.

c) *Résultats expérimentaux.*

Le tableau 9 reproduit les résultats obtenus avec des échantillons de DNA préparés par différentes méthodes décrites dans cette thèse (chap. III).

4. *Discussion.*

a) Classiquement, lorsque la réaction de Lowry est effectuée sur un mélange standard d'amino-acides ou sur une protéine *complétement* hydrolysée, seuls la tyrosine, le tryptophane, la cystéine (et la cystine) et à un degré moindre l'histidine réagissent ([43]).

Mais il en va différemment si l'on analyse un peptide, une protéine ou un mélange plus ou moins complexe.

TABLEAU 9

Taux de protéines dans des acides désoxyribonucléiques préparés par diverses méthodes.

Échantillons analysés	Méthode de préparation du DNA	Protéines				Concentration en DNA de la solution (mg/ml)	Taux de protéines dans les DNA
		D. O.	µg/dans la prise d'essai	Prise d'essai	µg/ml		
D	Aubin et coll.	0,180	42,0	0,8 ml	52,5	1,92	2,7 %
J	Kay et coll.	0,054	13,0	0,8 ml	16,2	4,15	0,4
K	Kirby	0,175	41,0	0,8 ml	51,2	2,04	2,5
P	Signer-Schwander	0,355	83,0	0,8 ml	103,7	3,34	3,1
Q	—	0,038	8,5	0,8 ml	10,6	1,40	0,76
R	—	0,420	100,0	0,8 ml	125,0	1,32	9,5
W	—	0,048	11,5	0,8 ml	14,4	3,26	0,44
X	—	0,040	9,0	0,8 ml	11,25	2,56	0,44

D'après les travaux de Shao Chia Chou et Goldstein ([43]) tous les dipeptides réagissent plus ou moins même si leurs amino-acides constitutifs ne réagissent pas isolément; par exemple le glycylglycine donne une réaction mais après hydrolyse de ce dipeptide, la réaction n'a plus lieu. D'un autre côté, la tyrosine et le tryptophane qui réagissent fortement voient leur réactivité diminuer s'ils sont liés à la glycine ou à la leucine. Il n'en est pas de même pour la cystéine qui pourtant réagit aussi fortement. Quant aux tripeptides contenant glycine ou leucine, ils réagissent comme les dipeptides, mais avec une intensité plus grande. Les tétrapeptidides contenant les mêmes amino-acides (glycine ou leucine) ont par contre une réactivité moindre que les tripeptides mais supérieure à celle des dipeptides.

Ce rapide aperçu nous permet de constater que la réaction de Lowry est déjà très complexe lorsqu'on s'adresse à une protéine pure à ou ses constituants.

b) Mais la réaction est encore plus complexe car de nombreuses substances peuvent interférer et réagir avec le réactif de Lowry, au même titre qu'une protéine :

Tout d'abord le phénol. Or certains DNA sont extraits en utilisant ce réactif. Par conséquent, et bien que le phénol soit théoriquement éliminé par des lavages successifs à l'éther après l'extraction du DNA, le taux des contaminants protéiques déterminé sur ce DNA est très certainement entaché d'erreurs ici par excès.

D'autre part, Sheperd et Hopkins ont montré l'interférence de certains nucléosides et nucléotides ([172]). Parmi ceux-ci la guanine, l'acide

guanylique, et la guanosine réagissent de façon significative comme le montre d'ailleurs la figure 23. Si on compare les figures 22 et 23, on constate que, à une D.O de 0,400 correspondent respectivement 95 µg de protéines et 300 µg d'acide guanylique par ml .La réaction est donc 3 fois plus sensible pour les protéines que pour l'acide guanylique. Toutefois, Sheperd et Hopkins ([172]) notent que les dérivés à désoxyribose réagissent considérablement moins que leurs homologues à ribose. Pour l'acide guanylique les rapports de réaction sont de 1 à 30. La réaction est donc $30 \times 3 = 90$ fois plus sensibles pour les protéines que pour l'acide désoxyguanylique.

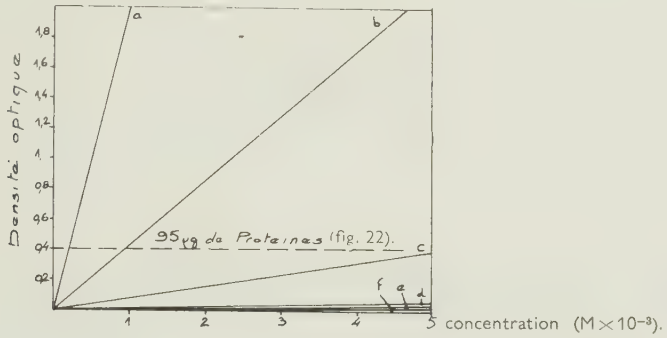


Fig. 23. — Coloration de certains dérivés de l'acide désoxyribonucléique avec le réactif de Folin-Ciocalteu selon Sheperd et Hopkins ([172]).

a: guanine; *b*: acide guanylique; *c*: guanosine; *d*: adenosine; *e*: cytidine; *f*: adénine, cytosine, thymine, thymidine, ac. adénylique, ac. cytidilique, ac. thymidilique.

D'autre part, des expériences faites sur des histones en absence et en présence de DNA ([172]) montrent que ce dernier possède un effet très légèrement dépresseur sur le développement de la coloration mais insuffisant pour perturber les résultats.

Étant donné que cette expérience a été réalisée uniquement avec des histones nous avons essayé de mettre en évidence un éventuel pouvoir inhibiteur de protéines sériques normales et de l'albumine bovine. Des gammes ont été réalisées avec ces deux protéines en introduisant en surcharge :

— une solution de DNA;

— une solution de DNA dénaturée par chauffage 10 minutes à 100° et refroidissement immédiat dans l'eau glacée;

— une solution de DNA hydrolysé par voie enzymatique (DNAse I et phosphodiestérase de venin de serpent).

Les résultats obtenus sont rassemblés dans les tableaux 10 et 11 et les figures 24 et 25.

Le DNA a été introduit dans la proportion de 10 µg pour 1 µg de protéines. Pour les expériences II, III, IV, il a été tenu compte dans

TABLEAU 10

Influence du DNA sur la réaction de Lowry établie avec un sérum étalon (Versatol).

Quantité de protéines analysées.....		7 µg	14 µg	28 µg	56 µg	84 µg	112 µg
Densités optiques I		0,030	0,063	0,115	0,220	0,320	0,400
Quantité de protéines analysées.....		7 µg	14 µg	29 µg	58 µg	87 µg	116 µg
Densités optiques.	II	0,038	0,070	0,125	0,240	0,330	0,405
	III	0,027	0,064	0,120	0,200	0,290	0,355
	IV	0,042	0,086	0,130	0,215	0,310	0,370

I. Sérum étalon seul.
II. Sérum étalon + solution de DNA.
III. Sérum étalon + solution de DNA dénaturé par la chaleur.
IV. Sérum étalon + solution de DNA hydrolysé par voie enzymatique (DNase I + phosphodiestérase de venin de serpent).

TABLEAU 11

Influence du DNA sur la réaction de Lowry établie avec une albumine bovine.

Quantité de protéines analysées.....		7 µg	14 µg	28 µg	56 µg	84 µg	112 µg
Densités optiques I		0,020	0,040	0,105	0,155	0,245	0,285
Quantité de protéines analysées.....		7 µg	14 µg	29 µg	58 µg	87 µg	116 µg
Densités optiques.	II	0,031	0,061	0,113	0,195	0,280	0,343
	III	0,022	0,052	0,115	0,190	0,295	0,355
	IV	0,030	0,060	0,105	0,180	0,265	0,335

I. Albumine bovine seule.
II. Albumine bovine + solution de DNA.
III. Albumine bovine + solution de DNA dénaturé par la chaleur.
IV. Albumine bovine + solution de DNA hydrolysé par voie enzymatique (DNase I + phosphodiestérase de venin de serpent).

l'établissement des courbes des protéines apportées par la solution de DNA (les quantités dosées sont légèrement supérieures).

Pour l'expérience IV, il a été tenu compte des protéines apportées au cours de l'hydrolyse enzymatique.

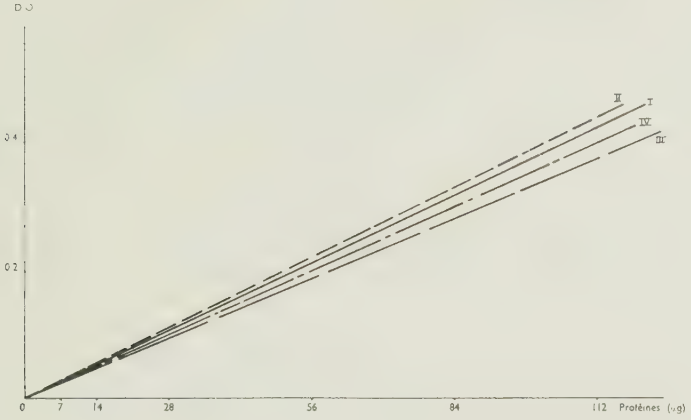


Fig. 24. — Influence du DNA sous divers états physico-chimiques sur la réaction de Lowry établie avec un sérum étalon (Versatol) (voir tableau 10).

I : sérum étalon seul;
II : sérum étalon + DNA;
III : sérum étalon + DNA dénaturé par la chaleur;
IV : sérum étalon + DNA hydrolysé par voie enzymatique.

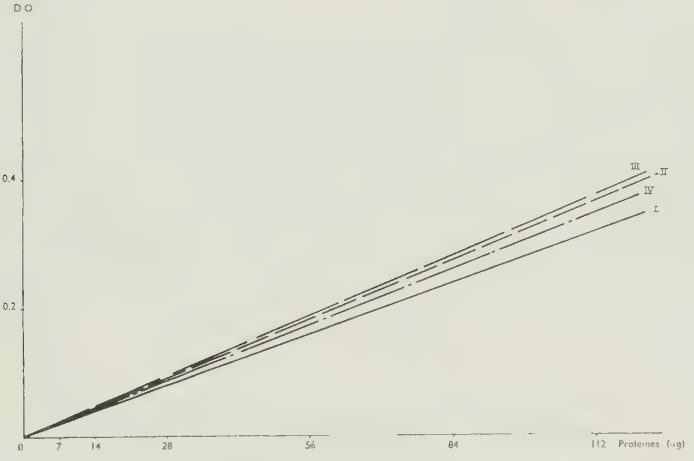


Fig. 25. — Influence du DNA sous divers états physico-chimiques sur la réaction de Lowry établie avec une albumine bovine (voir tableau 11).

I : albumine bovine seule;
II : albumine bovine + DNA;
III : albumine bovine + DNA dénaturé par la chaleur;
IV : albumine bovine + DNA hydrolysé par voie enzymatique.

Nous pouvons constater d'après ces tableaux que la réaction donnée par le réactif de Folin Cioccalteu est plus faible pour une solution d'albumine bovine que pour un sérum étalon (courbe I des figures 24 et 25). Il est donc préférable d'utiliser ce dernier réactif pour établir la courbe d'étalonnage si on ne connait pas la nature exacte des protéines analysées.

Nous constatons d'autre part que l'addition de DNA quel que soit son état physico-chimique, ne perturbe pas de façon sensible le développement de la réaction colorée, si la courbe d'étalonnage est tracée avec un sérum étalon. Les interférences sont faibles et n'excèdent généralement pas 15 %. Si nous nous reportons à la figure 22 (reproductibilité de la technique de Lowry) nous constatons que les différences de densité optique obtenues en réalisant plusieurs gammes étalon sont du même ordre de grandeur. Par contre, l'interférence est plus importante si l'étalonnage est réalisée avec une solution d'albumine bovine. C'est pourquoi nous avons choisi le sérum étalon comme protéine de référence.

Nous pouvons donc admettre que, dans nos conditions expérimentales, le dosage des protéines par la méthode de Lowry et coll. reste valable, même en présence des nucléotides provenant de l'hydrolyse du DNA.

4. Dosage des contaminants protéiques par formation de complexes cuivriques.

La méthode colorimétrique de Lowry présentant, comme nous l'avons signalé plus haut, quelques inconvénients au point de vue de la spécificité, nous avons pensé à utiliser une autre méthode pour doser les protéines. Nous avons pour cela employé une technique mise au point par Bohuon [22] pour le dosage des amino-acides urinaires, à partir des travaux de Borscher [26] et de Kekki [103].

La technique repose sur la propriété des amino-acides de former des complexes solubles en milieu alcalin avec divers métaux divalents et plus spécialement le cuivre. Le complexe peut être formé à partir d'une combinaison insoluble telle que le phosphate de cuivre et est du type (fig. 26).

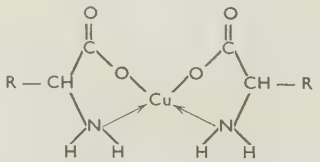


Fig. 26. — Nature du complexe cuivre acide amine.

Le dosage du cuivre, passé en solution à la suite de cette complexation constitue donc une mesure indirecte des acides aminés. Ce dosage est réalisé par colorimétrie en présence de cuprizone (biscyclohexanone

oxalyldihydrazone) qui déplace le cuivre de son complexe avec l'amino-acide en donnant une coloration bleue pour des concentrations de l'ordre du microgramme par millilitre. Nous remarquons donc que la sensibilité de cette méthode est légèrement supérieure à celle de Lowry puisque nous pouvons doser ainsi avec précision environ 5 µg d'amino-acide. Malheureusement cette technique ne s'est pas révélée adaptable aux protéines et plus spécialement aux PR.DNA. C'est pourquoi, malgré ses imperfections, nous avons utilisé au cours de ce travail la technique colorimétrique de Lowry qui reste actuellement une des plus facilement utilisables et une des plus rapides.

II. — DOSAGE SIMULTANÉ DE L'AZOTE ET DU PHOSPHORE.

Parmi les autres dosages que l'on peut effectuer sur une solution de DNA, il faut mentionner ceux de l'azote et du phosphore servant à la détermination du rapport $\frac{N}{P}$. La meilleure solution consiste, sans nul doute, à effectuer le dosage de l'azote et du phosphore sur le même minéralisat. Mais, comme le font remarquer Delsal et Manhouri ([62]), il est alors difficile de réaliser sans perte la minéralisation de très faibles quantités de phosphore. En principe, la minéralisation par l'acide sulfurique en présence de perhydrol tout en donnant de bons résultats pour le dosage du phosphore permet théoriquement de doser l'azote sur le même minéralisat. Toutefois, si on prolonge la réaction pour obtenir la minéralisation complète de l'azote des bases pyrimidiques, on peut alors observer des pertes de phosphore. C'est pourquoi de nombreux laboratoires dosent actuellement l'azote et le phosphore séparément. Pour essayer de remédier à ce désavantage, nous avons mis au point une méthode permettant le dosage simultané de l'azote et du phosphore dans des solutions de DNA ([61]). Dans cette technique la minéralisation n'est pas prolongée très longtemps; malgré cela, les résultats obtenus pour le dosage de l'azote ne sont pas sous évalués à condition, toutefois, d'étalonner la réaction, soit avec un DNA étalon, soit ce qui est plus simple, avec un mélange de nucléotides.

1. Appareillage et principe de la technique.

La minéralisation est réalisée dans un Autoanalyseur (*) ([68]) constitué par une hélice en « Pyrex », chauffée par des résistances électriques à environ 400 °C et tournant sur elle-même (fig. 27).

(*) Technicon, Chauncey New York.

L'échantillon à analyser et le liquide de minéralisation sont introduits à une des extrémités de l'hélice. A la sortie, l'échantillon minéralisé, préalablement dilué avec de l'eau distillée, est introduit dans une chambre de mélange et divisé en 2 parties pour la détermination colorimétrique de l'azote et du phosphore.

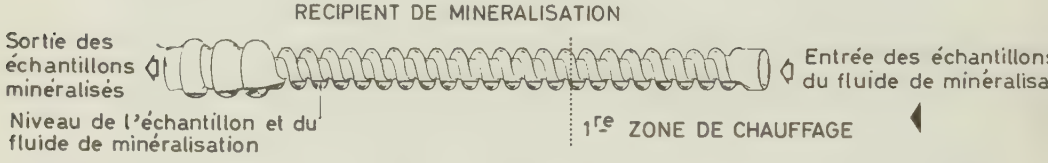


Fig. 27.

Dosage de l'Azote.

L'azote est dosé par la réaction colorée de Berthelot catalysée par le nitroprussiate de sodium.

Cette méthode présente plusieurs avantages : facilité d'exécution et automatisme permettant les dosages en série, alliés à une fidélité et à une sensibilité satisfaisantes. Une des difficultés que nous avons rencontrée pour adapter cette réaction au dosage de l'azote des acides désoxyribonucléiques réside dans la neutralisation du minéralisat. C'est pourquoi nous diluons l'échantillon avec de l'eau distillée avant d'effectuer la neutralisation par une solution d'hydroxyde de sodium en présence d'E.D.T.A. Nous sacrifions ainsi une partie de la sensibilité au profit d'une bonne reproductibilité. La réaction colorée est ensuite développée à 70° et lue à 625 mμ.

Dosage du phosphore.

Parmi les nombreuses méthodes utilisées pour le dosage du phosphore, nous avons retenu celle de Fiske et Subbarow ([71]) basée sur la formation d'acide phosphomolybdique réduit en un pigment bleu par l'acide 1 amino-2 naphtol-4 sulfonique.

L'échantillon est préalablement neutralisé par une solution d'hydroxyde de sodium à 20 % et la coloration obtenue après passage au bain-marie à 70° est lue à 660 mμ.

Nous avons préféré cette méthode à celle de Bell, Doisy et Briggs ([31]) utilisant l'hydroquinone en milieu sulfité et acide qui présente le désavantage d'une lente évolution de la coloration.

La méthode de Berenblum et Chain ([14]) au chlorure stanneux, quoique très spécifique, est difficilement adaptable à l'automation en raison des nombreuses manipulations et du temps qu'elle demande.

Enfin, la méthode de Truhaut, Bohuon et Le Talaer ([192]) utilisant la N-phényl para phénylènediamine quoique simple et très sensible, présente également l'inconvénient d'un lent développement de la coloration.

La technique décrite ici, ne nous permet pas cependant des analyses par microméthode. Nous comptons, pour ce faire, adapter la réaction de Misson ([133]) à notre technique en nous inspirant de l'adaptation que Courtois et Agneray ([44]) en ont faite à l'Autoanalyseur.

2. Schéma de montage.

Il est représenté sur la figure 28.

Les tubes servant à prélever le réactif de minéralisation sont en « acidflex », de même que le tube amenant l'air; car les vapeurs acides et les légers reflux enregistrés détérioraient rapidement le tube en tygon, provoquant un bullage irrégulier.

L'air servant à segmenter les échantillons au cours du dosage de l'azote est préalablement privé d'ammoniaque par passage sur une solution de SO_4H_2 à 10 % en volume.

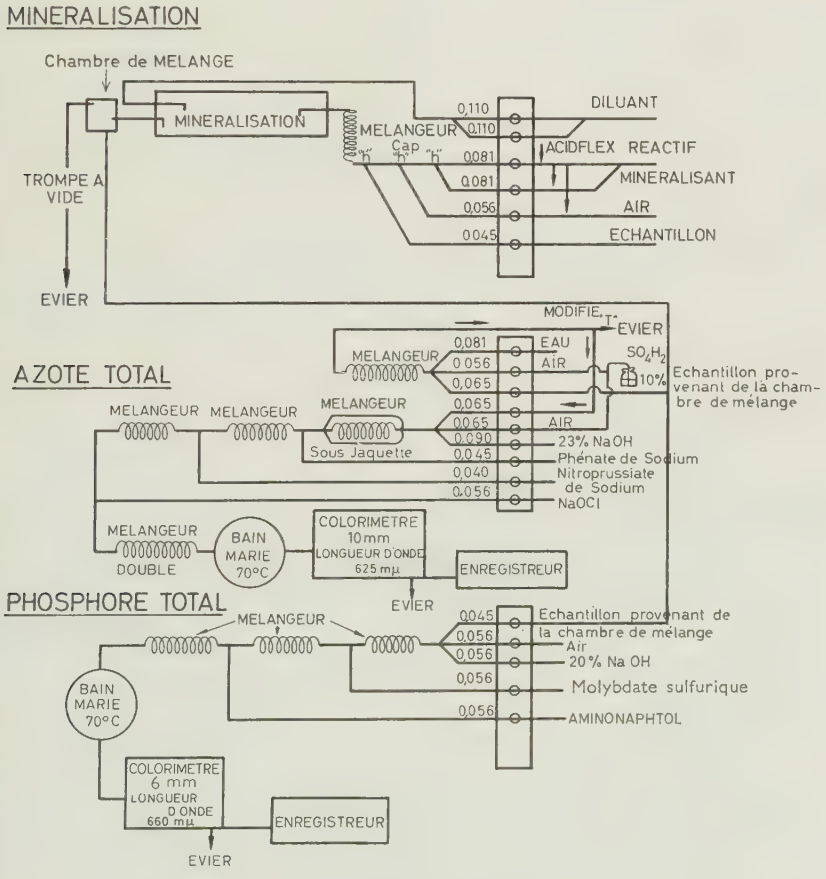


Fig. 28. — Dosage de l'Azote et du Phosphore.
Schéma de Montage.

3. Mode opératoire.

La vitesse de passage est de 20 échantillons à l'heure, chacun des échantillons étant séparé par de l'eau distillée. Cette faible cadence (10/heure) est nécessaire,

— pour éviter toute contamination entre 2 échantillons successifs d'acide désoxyribonucléique;

— pour permettre un lavage du tuyau de prélèvement, les solutions de DNA étant assez visqueuses.

La température choisie pour le développement des 2 réactions colorées est de 70°. Cette température unique permet l'utilisation d'un seul bain-marie à double bobine, tout en gardant une sensibilité très suffisante.

4. Réactifs.

a) *Réactif minéralisant.*

SO_4H_2 RP D 1,84	950 ml
ClO_4H RP 65 %	50 ml
V_2O_5	0,05 g

Dissoudre l'anhydride vanadique dans la quantité minimum d'eau distillée. Ajouter avec précaution l'acide sulfurique puis l'acide perchlorique.

Conserver dans un flacon ambré et bouché à l'émeri.

b) *Réactifs nécessaires au dosage de l'azote.*

Il est recommandé d'utiliser, pour les préparer, de l'eau bidistillée ou à défaut de l'eau distillée bouillie, refroidie et conservée à l'abri de l'ammoniaque.

Réactif neutralisant :

NaOH Merck	230 g
E.D.T.A. sel disodique	30 g
H_2O q.s.p.	1 000 ml

Phénate de sodium :

Solution aqueuse de NaOH à 40 %	500 ml
Solution aqueuse de phénol (merck) à 88 %	276 ml

Ajouter doucement et en agitant la solution de phénol dans la solution de soude continuellement refroidie par une circulation d'eau.

Compléter à 1 000 ml avec de l'eau bidistillée et conserver en flacon de polyéthylène.

Nitraprussiate de sodium :

Solution concentrée : réactif de Légal

Solution aqueuse de nitroprussiate à 10 %	parties égales
CH_3COOH cristallisable	

Conservation excellente en flacon coloré à + 4°.

Solution diluée obtenue par dilution au 1/60e de la solution concentrée avec de l'eau bidistillée.

Préparation extemporanée.

Hypochlorite de sodium : solution à 10° chlorométrique français.

c) *Réactifs nécessaires au dosage du phosphore.*

Réaction neutralisant :

NaOH Merck	200 g
H_2O bidistillée q.s.p.	1 000 ml

Molybdate sulfurique :

Molybdate d'ammonium R.P.	7,5 g
SO_4H_2 R.P. D 1,84	98,0 g
Eau bidistillée q.s.p.	1 000 ml

Conservation excellente en flacon de polyéthylène.

Aminonaphtol :

	SO_3HNa	150 g
ou	$S_2O_5Na_2$	137 g
	Sulfite de sodium anhydre	5 g
	Acide 1 amino 2 naphtol 4 sulfonique	2,5 g
	Eau bidistillée q.s.p.	1 250 ml

Dissoudre le bisulfite et le sulfite de sodium dans environ 800 ml. d'eau bidistillée. Chauffer vers 50 °C et ajouter l'acide aminonaphtol-sulfonique. Agiter jusqu'à dissolution presque complète.

Compléter à 1 250 ml et filtrer.

Conserver en flacon coloré et à + 4°.

5. Résultats.

Etalonnage.

L'azote des bases pyrimidiques se minéralisant assez mal, nous avons été contraints, pour ne pas sous évaluer les résultats, d'utiliser comme gamme étalon un mélange de nucléotides. La répartition des bases puriques et pyrimidiques dans les macromolécules d'acide désoxyribonucléique étant sensiblement égale nous avons utilisé un mélange d'acide adénylique et d'acide thymidilique préparé de la manière suivante :

Acide adénylique (N.B.C.)	200 mg
Acide thymidilique (N.B.C.)	200 mg
Eau bidistillée q.s.p.	100 ml

On ajoute quelques gouttes de ClH 2 N pour faciliter la mise en solution

1 ml de cette solution contient :

570 µg d'azote
362 µg de phosphore

une gamme est obtenue par dilution au 1/4, au 1/2 et au 3/4 de cette solution, contenant respectivement 142 µg d'azote et 90 µg de phosphore, 285 µg d'azote et 181 µg de phosphore. 428 µg d'azote et 272 µg de phosphore.

Les résultats obtenus sont reportés sur les figures 29 et 30.

Fig. 29. — Courbe d'étalonnage de l'azote.

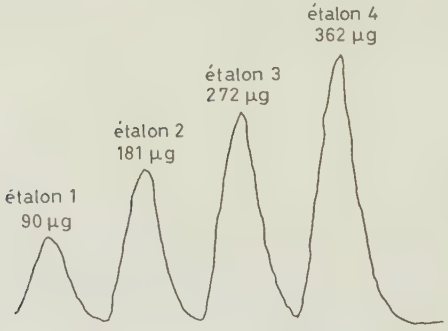


Fig. 30. — Courbe d'étalonnage du phosphore.

Reproductibilité. Sensibilité.

a) La reproductibilité est très satisfaisante et les variations du rapport N/P ne sont que très faibles. Les résultats obtenus en répétant les dosages sur quatre échantillons différents de DNA sont mentionnés dans le tableau 12.

Pour contre nous avons observé en analysant des échantillons pour lesquels le DNA était imparfaitement dissous, des différences très importantes. Deux exemples en sont fournis dans le tableau 13.

TABLEAU 12

Reproductibilité de la méthode du dosage simultané N et P dans des échantillons de DNA.

Échantillons	N (µg/ml)	P (µg/ml)	Rapport N/P
H	370 365	228 222	1,62 1,64
R	160 165	62 62	2,58 2,65
Y	355 357	230 230	1,54 1,55
19	185 195 190	108 110 108	1,71 1,77 1,75

N.B. Le rapport très élevé du lot n° R est dû à une contamination protéique importante (9,5 %).

TABLEAU 13

Importance de l'homogénéité des lots analysés pour le dosage N-P (dosage effectué sur deux lots hétérogènes).

Échantillons	N (µg/ml)	P (µg/ml)	Rapport N/P
F	220 240	150 143	1,47 1,68
J	315 400	212 265	1,48 1,51

Dans un des cas, toutefois, le rapport N/P n'est que très faiblement modifié.

Il est donc très important d'obtenir une solution vraiment homogène des échantillons soumis à l'analyse.

b) Quant à la sensibilité, légèrement sacrifiée au profit de la reproductibilité comme il a été dit plus haut, elle est encore très satisfaisante. Nous pouvons apprécier environ 20 µg de phosphore et 40 µg d'azote.

Les résultats obtenus avec quelques échantillons d'acide désoxyribonucléique sont résumés dans le tableau 14.

TABLEAU 14

Détermination de l'azote et du phosphore sur quelques échantillons d'acide désoxyribonucléique.

Échantillons	N (µg/ml)	P (µg/ml)	Rapport N/P
A	105	62	1,69
B	95	52	1,83
C	130	78	1,67
D	330	165	2,00
E	165	90	1,83
G	220	132	1,67
H	370	228	1,62
K	185	107	1,73
X	435	272	1,60

6. Conclusion.

En résumé, cette technique permet de doser automatiquement l'azote et le phosphore des DNA. Ces dosages sont effectués à partir d'un même échantillon et d'un même minéralisat ce qui représente un avantage sur les techniques précédemment utilisées.

Les résultats présentés montrent une bonne reproductibilité ainsi qu'une sensibilité satisfaisante.

Nous avons également utilisé cette technique pour déterminer la concentration en azote et en phosphore totaux de diverses fractions obtenues après chromatographie des PR.DNA sur Dowex 50 × 2 (chapitre VI). C'est ainsi que la détermination du phosphore total par exemple, nous a permis d'exclure la présence de nucléotides dans certaines fractions.

III. — AUTRES ANALYSES EFFECTUÉES SUR LES SOLUTIONS DE DNA.

1. Détermination de la concentration en DNA des solutions.

A. *Lecture en ultra-violet à* 260 mµ.

Cette méthode est basée sur le fait que les DNA en solution absorbent la lumière ultraviolette à des longueurs d'onde comprises entre 230 et 290 mµ avec un maximum d'absorption à 260 mµ. Sachant que 1 µg de P. ADN donne une densité optique de 0,212 à 260 mµ, il est donc

facile de connaître la concentration de la solution en P. ADN et donc en DNA puis quele P. ADN représente 9,6 % de la molécule de DNA. Mais cette technique n'est pas spécifique des polynucléotides car l'absorption est due au système des doubles liaisons conjuguées des cycles puriques et pyrimidiques. Elle caractérise donc les purines et les pyrimidines mais également toutes les substances qui les contiennent que ce soient des nucléosides, des nucléotides ou des acides nucléiques. Aussi bien n'y a t-il aucune différence quantitative significative dans l'absorption du RNA et du DNA.

B. *Dosage du désoxyribose.*

Nous pouvons, pour déterminer la concentration en DNA d'une solution, doser l'un de ses constituants, le désoxyribose. Pour ce faire, le DNA en solution (10 à 70 µg/ml) est hydrolysé en milieu perchlorique (ClO_4H 0,5 N) pendant 20 minutes à 70°. Le désoxyribose est ensuite dosé sur l'hydrolysat selon la technique de Dische ([64]) modifiée par Burton ([32]) par addition à 1 volume de solution de 2 volumes de réactif à la diphénylamine qui donne une coloration bleue avec le désoxyribose. Après 16 heures à la température du laboratoire, la densité optique est mesurée à 600 mµ.

L'étalonnage est obtenu en opérant dans les mêmes conditions :

— soit à partir d'une solution de désoxyribose;

— soit à partir de DNA pur. La courbe étalon est alors tracée en fonction du phosphore désoxyribonucléique (ADN-P) et sa valeur dépend de l'absence, dans le DNA étalon, d'impuretés phosphorées. Dans ces conditions 1 µg de ADN-P donne une densité optique de 0,130.

Il est également bon de savoir que, au cours du dosage du DNA, seul le désoxyribose lié aux bases puriques entre en réaction ce qui revient à doser sensiblement la moitié du désoxyribose total. On a toujours :

$$\frac{\text{Mole de désoxyribose dosée}}{\text{Atome g de P dans le DNA}} = 0{,}46 \text{ à } 0{,}48.$$

2. Analyse spectrophotométrique des solutions de DNA.

A. *Absorption à* 260 mµ.

Comme nous venons de le voir, le DNA en solution absorbe la lumière ultraviolette avec un maximum à 260 mµ. Cette propriété peut servir à son dosage.

B. *Rapports des absorptions à différentes longueurs d'onde.*

Parmi les différentes substances que l'on peut rencontrer dans une solution de DNA, les protéines ont, elles aussi, la propriété d'absorber

la lumière ultraviolette, notamment vers 230, 240 et 280 mμ. Par conséquent, la détermination des rapports de la densité optique maximum (260 mμ) à la densité optique obtenue pour ces longueurs d'onde (230, 240 et 280 mμ) servira de critère de pureté du DNA. Si le DNA est contaminé, les rapports seront abaissés. Le tableau 15 reproduit les rapports théoriques ainsi que ceux obtenus avec certains DNA préparés au laboratoire.

TABLEAU 15

Rapports des densités optiques de plusieurs solutions de DNA.

Rapports des λ	$\frac{260}{230}$ mμ	$\frac{260}{240}$ mμ	$\frac{260}{280}$ mμ
Valeurs théoriques	2,30 ± 0,20	1,77 ± 0,10	1,77 ± 0,06
B	2,16	1,71	1,80
F	2,23	1,73	1,81
P	2,00	1,63	1,86
Q	2,22	1,74	1,86
W	2,25	1,71	1,80

C. *Détermination des spectres d'absorption.*

Étant donné que les maximum d'absorption du DNA et des protéines ne sont pas exactement identiques, nous avons pensé utiliser cette particularité pour doser spectrophotométriquement les protéines contaminant les solutions de DNA. Dans ce but, nous avons établi le spectre d'absorption des solutions suivantes (fig. 31 et 32).

a) Solution dans NaCl 0,14 M d'un DNA, relativement pauvre en protéines :

lot Q;
concentration : 28 μg/ml;
pH 6,9;
taux de protéines : 0,7 %.

b) Solution d'un DNA riche en protéines :

Lot R;
concentration 26 μg/ml;
pH 7,0;
taux de protéines : 9,5 %.

c) Solution des 4 nucléotides constituant le DNA :

concentration $0{,}2 \times 10^{-3}$ M;
pH 10,2 (ce pH élevé s'explique par l'addition de quelques gouttes de soude, nécessaire à leur mise en solution).

d) Solution d'histones totales de thymus de veau :

concentration 0,5 %;
pH 1,6 (en effet les histones, comme les protamines, ne sont solubles qu'en milieu acide).

e) Solution de sulfate de protamine :

concentration 0,4 %;
pH 4,7 (cf. *d*).

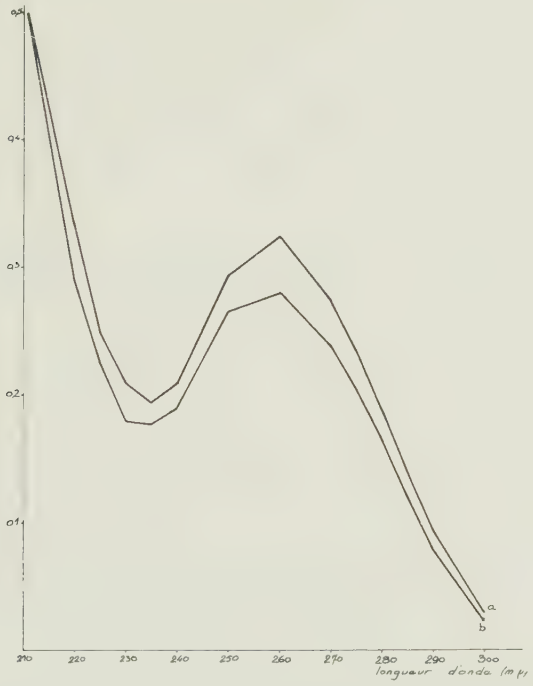


Fig. 31. — Spectre d'absorption.

a) d'une solution de DNA pauvre en protéine;
b) d'une solution de DNA riche en protéines.

Nous avons choisi ces protéines puisque dans les nucléoprotéines, les DNA sont essentiellement associés à des protéines basiques. Il est donc indispensable de connaître le spectre d'absorption de telles protéines. Nous avons pu déduire des résultats observés (fig. 31-32).

1° Qu'il n'existe aucune différence significative entre le spectre d'un DNA riche en protéines et celui d'un DNA peu contaminé. Les différences d'absorption sont toujours proportionnelles aux différences des concentrations en DNA.

2° Qu'une solution de nucléotides, exempte de protéines, possède un spectre très voisin d'une solution de DNA et absorbe notablement vers 220 mμ.

3° Que les solutions des deux protéines basiques ont des spectres sensiblement identiques. Notamment, elles ne possèdent pas de maximum d'absorption à 280 mμ puisqu'elles ne contiennent pas de tryptophane et peu de tyrosine (absence totale pour les protamines et 1 à 2 % pour les histones).

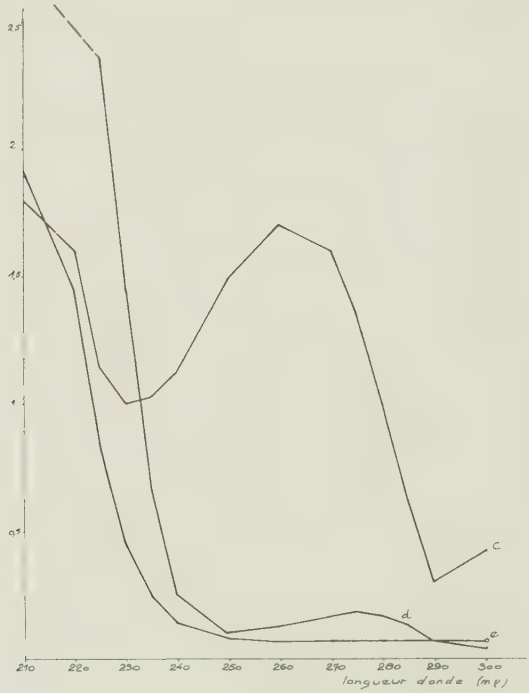


Fig. 32. — Spectre d'absorption

c) d'une solution de nucléotides;
d) d'une solution d'histones;
e) d'une solution de protamines.

Le dosage des protéines dans les DNA par spectrophotométrie différentielle n'est donc pas réalisable puisque :

— d'une part une variation importante du taux des PR-DNA ne provoque pas de modification du spectre d'absorption;

— d'autre part une solution de nucléotides (donc sans protéines) absorbe pour des longueurs d'onde inférieures à 230 mμ, pour lesquelles l'absorption des protéines est très importante.

D. *Hyperchromicité.*

Une autre détermination spectrophotométrique importante est la mesure de l'effet hyperchromique. L'absorption en lumière ultraviolette (260 mμ) d'une solution de DNA est inférieure à l'absorption des cons-

tituants de ce DNA, libérés par hydrolyse. La présence de liaisons hydrogènes qui apparient les bases et modifient de ce fait les propriétés optiques de ces composés puriques et pyrimidiques explique en partie le phénomène d'hyperchromicité. L'empilement des bases le long de la chaîne désoxyribose phosphate intervient également.

Sa mesure se fait après hydrolyse totale du DNA (Cl H 0,1 N-70°-30 minutes). L'eugmentation de densité optique à 260 mμ de la solution hydrolysée, compte tenu du facteur de dilution apporté par Cl H 0,1 N exprimée en pourcentage de la densité optique maximum avant dégradation du DNA, traduit l'effet hyperchromique.

Un abaissement de ce pourcentage (normalement compris entre 38 et 50 %) traduit une dépolymérisation et une dénaturation du DNA, probablement dues aux ruptures de liaisons labiles entre les bases puriques et pyrimidiques ([171, 191]).

IV. — SÉPARATION ET DOSAGE DES AMINO-ACIDES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

Cette technique, que nous avons largement utilisée au cours de ce travail, mérite une description particulièrement détaillée. Son introduction relativement récente dans l'étude de la chimie des protéines présente en effet de gros avantages sur les techniques précédemment utilisées et ses applications sont nombreuses et variées.

En 1950, Stein et Moore ([186]) ont montré qu'un mélange de 18 amino-acides pouvait être complètement résolu par chromatographie sur une colonne de Dowex 50 × 8 en éluant avec une solution d'acide chlorhydrique de normalité croissante (1,5 N à 4,0 N). Par la suite, ces auteurs modifièrent leur technique en utilisant des solutions tampons de pH progressivement croissant, depuis 34, jusqu'à 11 ([136]). Des modifications ultérieures furent encore apportées : changement du type de la résine utilisée, modification du gradient d'élution, de la longueur de la colonne, du temps de la chromatographie, de la température, etc. ([137, 135, 180]).

Nous avons utilisé au cours de ce travail une technique inspirée de la technique initiale de Moore et Stein et modifiée par Piez et Morris ([156]) avec un appareillage automatique (*) permettant une meilleure reproductibilité des résultats.

A. Principe.

L'ensemble de la technique peut être divisé en 2 parties :

1° La séparation chromatographique sur colonne.

2° Le dosage des amino-acides ainsi séparés.

(*) Technicon, Chauncey, New York.

1. *Séparation chromatographique des amino-acides.*

Elle est réalisée sur une colonne d'une longueur de 133 cm et d'un diamètre de 0,6 cm, remplie avec une résine polystyrène sulfonée Dowex 50 × 8 (c'est-à-dire à 8 % de liaisons croisées) sous forme sodique. Ce type de résine permet la séparation de tous les acides aminés courants *en une seule opération.* L'élution est effectuée par une solution dont le pH et la molarité sont réglés par un dispositif automatique de gradient variable (**) ([150]) permettant le mélange progressif, au cours de la chromatographie, du contenu de chacune des cellules de l'appareil : la composition du tampon de chaque cellule (tableau 16) entraîne un changement progressif du pH et de la molarité du tampon introduit au sommet de la résine. Cette chromatographie « par élution » permet une meilleure résolution que la chromatographie dite « par déplacement » et une récupération très satisfaisante des amino-acides. Les acides aminés ne saturent qu'une très faible hauteur de la colonne de résine. De ce fait les quantités d'amino-acides mises en jeu doivent rester faibles. En augmentant graduellement le pH et la molarité du tampon d'élution, on diminue progressivement l'affinité des acides aminés pour la résine. En modifiant ainsi de façon continue l'équilibre résine-tampon, on fait passer en solution des acides aminés dont l'ionisation n'est plus suffisante pour en assurer la fixation sur les groupes polaires de la résine ([20]).

2. *Le dosage des amino-acides*

A la sortie de la colonne, chaque amino-acide est dosé séparément et automatiquement par la réaction classique donnée par la ninhydrine après 7 minutes au bain-marie à 95 °C. Les lectures des effluents ainsi colorées sont effectuées à 570 mμ et à 440 mμ (identification de la proline et de l'hydroxyproline) dans des colorimètres à cuves à flux continu de 15 mm de traversée optique.

B. Technique.

1. *Fonctionnement de l'ensemble de l'appareil au cours d'une chromatographie complète.*

Un schéma d'ensemble de l'appareil (fig. 33) permettra de suivre plus aisément le déroulement des différentes manipulations.

La résine, sous sa forme sodique, est préalablement équilibrée avec le pH initial du gradient, par l'introduction dans les circuits d'une solution tampon de pH 2,875. Le mélange soumis à l'analyse chroma-

(**) Autograd Technicon, Chauncey, New York.

tographique est ensuite introduit dans le haut de la colonne sous un faible volume (environ 1 ml). Lorsque ce mélange est absorbé sur la résine, on fait arriver grâce à un robinet à 3 voies, la solution éluante contenue dans « l'autograd ». Une pompe fait arriver cette solution, sous une forte pression (environ 20 kg/cm²). Cette pression doit être maintenue constante pendant toute la chromatographie et est contrôlée par un manomètre. Un débimètre installé en dérivation sur le circuit du liquide éluant permet de mesurer le volume délivré par la pompe (dans nos expériences 30 ml/heure).

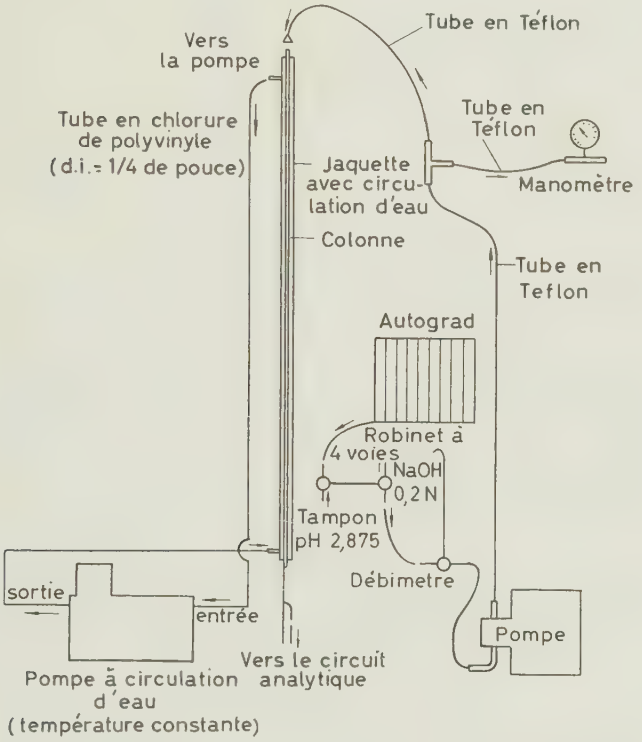


Fig. 33. — Schéma Général de l'Appareil utilisé pour la Chromatographie des Amino-Acides (selon Moore et Stein).

La chromatographie est réalisée à une température constante de 60 °C grâce à une jaquette entourant la colonne. Toutefois pour assurer une bonne séparation du bloc thréonine-sérine, nous maintenons la température à 40 °C pendant les deux premières heures de la chromatographie. Une opération complète demande 22 heures et permet, la séparation de tous les amino-acides constitutifs des protéines en commençant par les acides aminés acides et en terminant par les acides aminés basiques.

2. *Préparation du gradient d'élution.*

a) *Solutions tampon.*

1) *Solution de pH* 2,875 :

acide citrique Merck	10,51	g
eau bidistillée	800	ml
NaOH 2 N	100	—
2.2′ thiodiéthanol	5	—
Brij 35	10	—
(solution à 50 % dans H_2O)		
Ajuster au pH avec ClH 6 N		
Eau bidistillée q.s.p.	1 000	—

2) *Solution de pH* 3,80 :

Acide citrique Merck	10,51	g
eau bidistillée	800	ml
NaOH 2 N	100	—
2.2′ thiodiéthanol	5	—
Brij 35	10	—
Ajuster au pH avec ClH 6 N		
Eau bidistillée q.s.p.	1 000	—

3) *Solution de pH* 5,00 :

Acide citrique Merck	10,51	g
eau bidistillée	800	ml
NaOH 2 N	100	—
Chlorure de sodium R.P.	58,45	g
Brij 35	10	ml
Ajuster au pH avec ClH 6 N		
Eau bidistillée q.s.p.	1 000	—

— le Brij est un détergent possédant un groupement ammonium quaternaire et a un rôle de conservateur;

— le 2,2′ thiodiéthanol, encore appelé thiodiglycol, est un anti-oxydant empêchant les transformations :

méthionine ⟶ méthionine sulfoxides,
cystéine ⟶ cystine.

Il correspond à la formule $S\ (CH_2 — CH_2OH)_2$.

Ce réactif n'est pas introduit dans le dernier tampon car lors de son arrivée sur la résine, ces deux amino-acides sont déjà élués.

Il est recommandé, pour préparer ces réactifs, d'utiliser de l'eau bidistillée, ou à défaut de l'eau distillée bouillie et conservée à l'abri de l'ammoniaque.

b) *Gradient d'élution.*

Les 9 chambres de l' « autograd » sont remplies comme il est indiqué sur le tableau 16.

TABLEAU 16

CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DES AMINO-ACIDES
PRÉPARATION DU GRADIENT D'ÉLUTION.

Chambres de l'autograd	Tampon de pH 2,875	Tampon de pH 3,80	Tampon de pH 5,00
1	75 ml	0 ml	0 ml
2	75 —	0 —	0 —
3	75 —	0 —	0 —
4	75 —	0 —	0 —
5	0 —	70 —	5 —
6	6 —	9 —	60 —
7	0 —	0 —	75 —
8	0 —	0 —	75 —
9	0 —	0 —	75 —

3. *Dosage des amino-acides.*

Dans cette deuxième étape de l'analyse, une partie de l'éluat (0,32 ml/mn) est prélevée et mélangée au réactif à la ninhydrine. Le mélange obtenu est fragmenté par de l'azote (l'air est à proscrire pour éviter une oxydation de la ninhydrine) et arrive dans un bain-marie à 95 °C où il circule pendant 7 minutes, puis successivement dans deux colorimètres : l'un permet la lecture de la coloration bleue-violette (570 mμ) et le deuxième (440 mμ) permet la lecture de la coloration jaune donnée par la proline et l'hydroxyproline.

Les deux colorimètres sont reliés à un enregistreur multiple qui fournit les densités optiques correspondant aux différents amino-acides.

Le schéma de la réaction est indiqué sur la figure 34.

Préparation du réactif à la ninhydrine.

Il est réalisé suivant les indications données par MOORE et STEIN [138].

Ninhydrine	20	g
Hydrindantine	3	g
E.D.T.A. sel disodique	0,05	g
2 méthoxy éthanol	750	ml
Tampon pH 5,5	250	ml

Dissoudre le ninhydrine et l'hydrindantine dans le 2 méthoxy éthanol.

Dissoudre l'E.D.T.A. dans la solution tampon.

Mélanger.

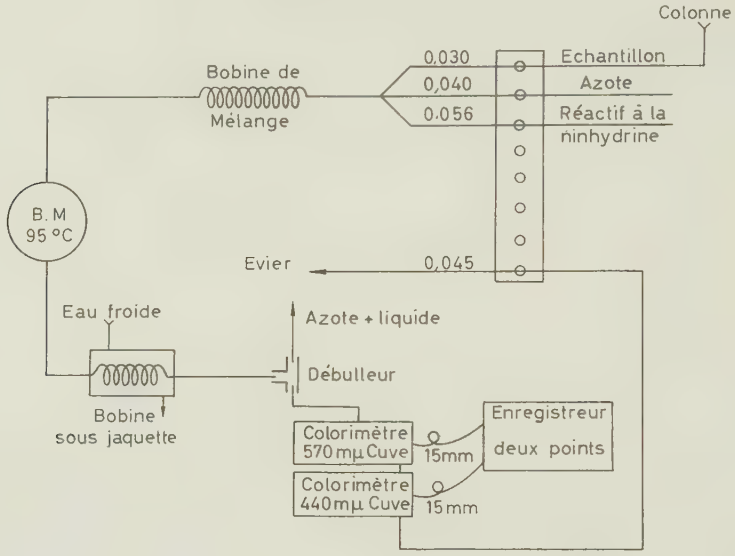
Faire barbotter de l'azote dans le mélange.

Ajouter alors :

2 méthoxy éthanol dilué au 1/2 avec de l'eau bidistillée	4 000 ml

Faire à nouveau barbotter de l'azote avant l'utilisation.

Dans ces conditions, le réactif se conserve quelques jours s'il est maintenu sous azote, à l'abri de l'air et de la lumière.



Toutes les connections doivent être réalisées en verre ou en tube « Solvaflex ».

Fig. 34. — Schéma de montage pour le dosage des amino-acides séparés par chromatographie sur Dowex 50 × 8.

Préparation du tampon pH 5,5.

Acétate de sodium anhydre R.P.	1 640 g
Acide acétique Merck	500 g
Eau bidistillée q.s.p.	5 000 ml

Le pH est alors de 5,51 ± 0,03. Si un ajustement du pH est nécessaire 5 g de NaOH correspondant à environ 0,04 unité pH.

C. Résultats obtenus.

La figure 35 fournit un exemple de chromatographie obtenue dans les conditions décrites ci-dessus.

Ce chromatogramme a été obtenu avec un mélange standard de 24 amino-acides, en solution dans l'eau distillée à la concentration de une micromole pour chaque amino-acide. Les pics obtenus correspondent à 0,2 μmole.

Lecture quantitative du chromatogramme.

Pour interpréter quantitativement les résultats chromatographiques obtenus, nous établissons un « coefficient d'intégration » calculé sur une chromatographie pour laquelle la concentration en amino-acides est

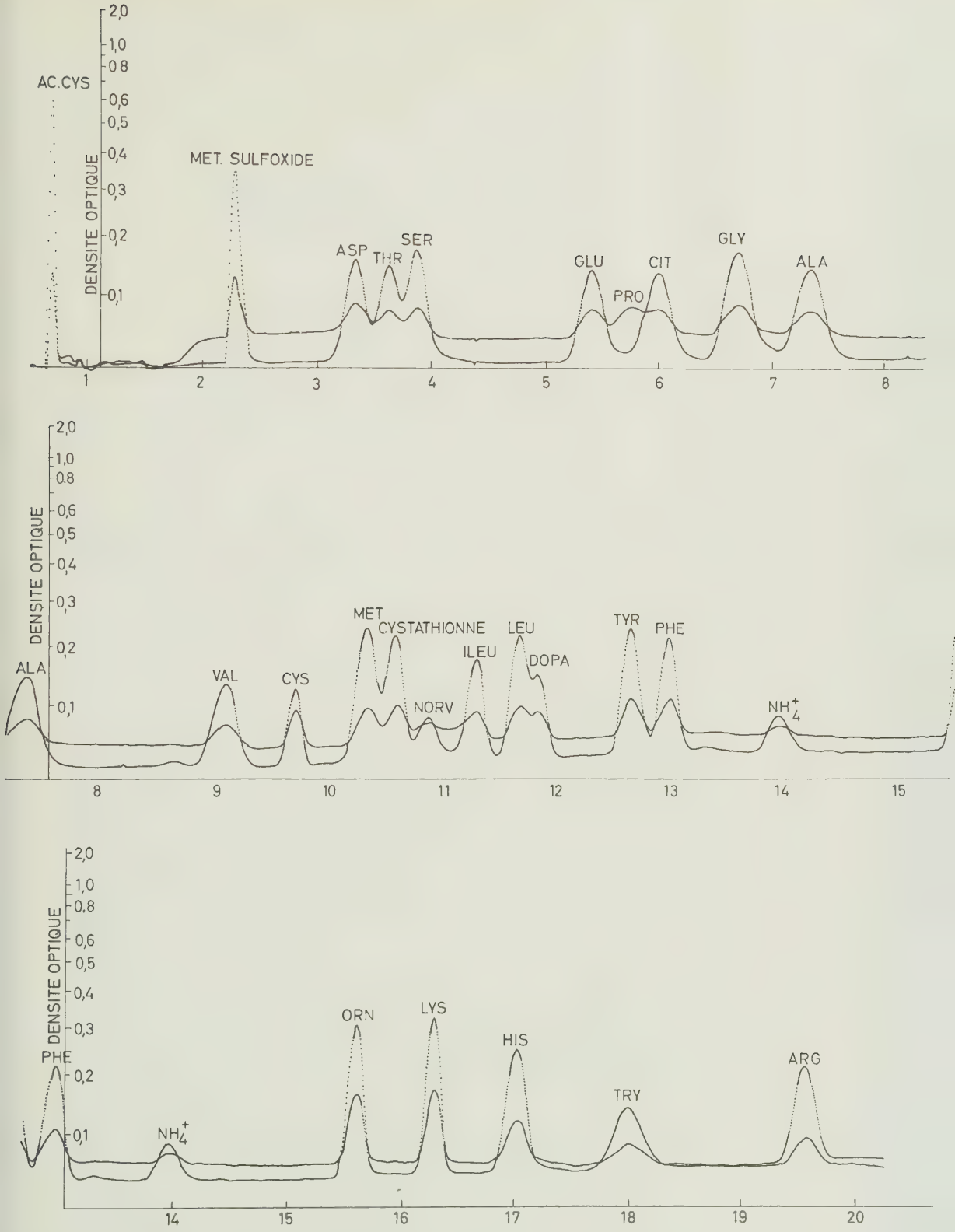


Fig. 35. — Enregistrement d'une chromatographie sur Dowex 50 × 8 d'un mélange standard d'amino-acides. Chaque pic correspond à 0,2 μMole de l'Amino-acide considéré.

connue. Ce coefficient est proportionnel à la surface du pic et calculé d'après la formule suivante :

$K = L \times H$.
L = largeur du pic à la demi-hauteur réelle (en cm).
H = hauteur réelle du pic (en densité optique $\times$ 1 000) ou
$H = h_t - h_b$.
h_t = hauteur totale du pic (même unité).
h_b = hauteur de la ligne de base.

D. Discussion.

1. *Difficultés de la technique et précautions à prendre.*

Cette technique nous a donné dans l'ensemble de bons résultats. Néanmoins son application reste relativement délicate car il est nécessaire de prendre de grandes précautions pour éviter toute contamination et pour obtenir des résultats reproductibles.

a) *Nature de la résine.*

Deux caractéristiques sont importantes à considérer : le degré de réticulation (le « cross-linkage » des auteurs américains) et la finesse du grain.

Le degré de réticulation intervient dans le pouvoir séparateur de la résine : sa capacité est d'autant plus grande que le pourcentage de réticulation est élevé. Par contre les résines à faible degré de réticulation ayant une porosité plus grande, permettent le fractionnement de molécules de poids moléculaire plus élevé (séparation de petits peptides sur Dowex 50 $\times$ 4). Par conséquent, le fractionnement des amino-acides nécessite une résine à fort pourcentage de liaisons croisées.

La dimension des grains de la résine utilisée est également importante. Car la finesse et l'homogénéité de la résine conditionne l'efficacité de la colonne. Le tamisage de ces résines peut être réalisé grâce au procédé hydraulique mis au point par Hamilton ([87]). Pratiquement, vue la longueur de l'opération il est plus simple d'utiliser une résine vendue dans le commerce (*) parfaitement calibrée à 22 microns et qui nous a donné toute satisfaction. Mais en revanche cette qualité de résine nécessite des pressions relativement importantes au sommet de la colonne si l'on veut obtenir un débit suffisant de l'éluat (environ 20 kg/cm^2).

D'autre part, pour obtenir de bonnes résolutions, il est nécessaire de régénérer la résine après chaque chromatographie par passage d'une solution de NaOH 0,2 N pendant 20 minutes environ. Après quoi, la colonne est équilibrée avec le tampon initial du gradient d'élution avant la mise en route d'une autre chromatographie. Ce lavage à la soude est absolument essentiel si l'on veut obtenir une bonne récupération de l'histidine ([137]).

(*) Chromobeads. Type A. Technicon, Chauncey, New York.

b) *Solutions tampon.*

La préparation des différentes solutions tampons doit être effectuée avec le plus grand soin possible.

1) le pH doit être déterminé avec une précision de l'ordre de 0,02 unité pH. Toute variation supérieure entraîne des modifications importantes :

— séparation incomplète de l'acide aspartique, de la thréonine et de la sérine ;

— intervention dans l'ordre de passage des acides aminés basiques ([88]).

2) La molarité des différentes solutions a également une grande importance notamment pour le tampon de pH 5,00.

L'augmentation de la concentration en ions Na^+ provoque en effet une accélération dans l'élution des acides aminés basiques sauf pour le tryptophane qui au contraire est retardé ([88]).

3) Enfin les solutions tampons doivent être absolument privées d'ions NH_4^+ qui réagissent avec le réactif à la ninhydrine. Une concentration trop importance entraîne après le passage du pic correspondant à l'ammoniaque une augmentation très importante de la ligne de base.

Leur préparation doit donc s'effectuer avec de l'eau bidistillée comme nous l'avons dit précédemment. D'autre part, nous avons constaté une conservation excellente par addition d'une légère couche d'huile de vaseline afin d'éviter toute contamination par l'ammoniaque de l'air.

c) *Autres facteurs nécessaires à la réalisation d'une bonne chromatographie :*

1) *Température.*

Elle joue un rôle important pour l'obtention d'une bonne séparation. Étant donné le haut degré de réticulation de la résine, il est nécessaire d'opérer à température élevée ([20]). Mais il faut savoir que la vitesse d'élution des acides aminés basiques varie avec la température comme l'indique Hamilton ([88]). Une température supérieure à 60° provoque même une inversion dans l'ordre de passage des pics (le tryptophane est élué avant l'histidine).

Il est donc nécessaire d'opérer à température constante ($\pm$ 0,5°). Tous nos chromatogrammes ont été réalisés à 60 °C. Mais si cette température élevée est appliquée dès le début de la séparation, on observe alors un chevauchement de la thréonine et de la sérine. Pour cette raison, pendant les 2 premières heures de la chromatographie, la température est maintenue à 40 °C.

2) *Débit de l'éluant.*

Celui-ci doit être exactement réglé avant le départ de la chromatographie et maintenu constant par la suite. En effet, une petite variation de débit entraîne une élution accélérée, donc une séparation imparfaite.

2. *Valeur de la technique.*

a) *Interférences.*

La ninhydrine réagit avec les groupements NH_2 libres des acides aminés ([213]). Cette réaction n'est donc absolument pas spécifique des amino-acides et sera donnée par de nombreux autres corps renfermant ces groupements NH_2 et même par des composés non azotés.

1) *Composés azotés :*

Ils sont très nombreux et Hamilton ([88]) a dressé une liste de 148 composés chromatographiés sur la résine utilisée et réagissant avec la ninhydrine. Parmi ceux-ci de très nombreux di ou tri peptides, des sucres aminés, des amines...

2) *Composés non azotés :*

Il s'agit principalement d'aldéhydes, de cétones, d'acides cétoniques, de monosaccharides. Tous ces composés réagissent avec la ninhydrine et sont détectés à 440 mμ, longueur d'onde déjà utilisée pour l'estimation de la proline et de l'hydroxyproline. Ils sont généralement éludé avant l'acide aspartique, c'est-à-dire dans les trois premières heures de la chromatographie ([168]).

Il faut donc être très prudent avant de conclure à tel ou tel amino-acide sur la seule présence d'un pic à un endroit défini du chromatogramme.

b) *Reproductibilité.*

Deux facteurs peuvent intervenir pour provoquer une mauvaise récupération des amino-acides introduits dans le haut de la colonne.

1) *La chromatographie.*

Certains amino-acides peuvent subir des pertes ou des décompositions au cours de la chromatographie. Le tableau 17 reproduit la moyenne des pourcentages de récupération après la chromatographie selon Moore et Stein ([137]).

TABLEAU 17

Pourcentage de récupération des amino acides après chromatographie sur Dowex 50 × 8.

Acides aminés	Pourcentage de récupération	Acides aminés	Pourcentage de récupération	Acides aminés	Pourcentage de récupération
ASP	102	ALA	100	TYR	100
THR	99	VAL	102	PHE	101
SER	101	CYS	98	NH_4	105
PRO	101	MET	90	LYS.....	100
GLU	100	ILEU	97	HIS	98
GLY	100	LEU	100	ARG	101

La mauvaise récupération de la méthionine est probablement due à une oxydation du groupement soufré par suite d'une protection incomplète par le thiodiglycol. Par la suite, les mêmes auteurs ont montré que la cystéine n'était pas tout à fait stable durant la chromatographie. Elle est lentement oxydée et une partie du composé résultat peut apparaître au niveau de la proline ([139]).

Néanmoins, si l'on excepte les acides aminés soufrés légèrement oxydés, la récupération est excellente et il n'est pas besoin d'introduire de facteur de correction.

2) *Le dosage.*

Si la récupération chromatographique est en fait pratiquement totale, c'est lors du dosage des acides aminés, par contre, que des problèmes se posent. Nous avons déterminé (tableau 18) les coefficients d'intégration des différents amino-acides en faisant la moyenne de plusieurs chromatographies.

TABLEAU 18

Reproductibilité de la réaction a la ninhydrine donnée par les amino-acides après un séjour de 7 minutes a 95 °c et a l'obscurité.

Acides aminés 0,2 µMole	Coefficient d'intégration	Acides aminés 0,2 µMole	Coefficient d'intégration	Acides aminés 0,2 µMole	Coefficient d'intégration
CYS Ac ..	351 ± 49	VAL	356 ± 20	LYS.....	453 ± 26
ASP	376 ± 19	MET	419 ± 8	HIS	282 ± 18
THR	396 ± 54	NOR-VAL.	100 ± 11	TRY	413 ± 13
SER	387 ± 45	ILEU	278 ± 10	ARG	340 ± 2
GLU	386 ± 51	LEU	375 ± 16	DOPA ...	313 ± 22
GLY	462 ± 60	TYR	374 ± 29	CIT	317 ± 51
ALA	438 ± 55	PHE	371 ± 20	PRO	92 ± 28
CYS	150 ± 32	ORN	502 ± 17		

Ce tableau nous montre que la réaction donnée par les amino-acides avec la ninhydrine n'est pas très reproductible tout au moins pour certains amino-acides.

Cet inconvénient est peut-être dû au fait que le réactif à la ninhydrine n'est pas très stable même conservé à l'obscurité et sous azote. De toute façon il oblige à être assez large dans l'interprétation de nos chromatogrammes et à ne considérer comme significatives que des variations de ± 10 %.

c) *Étalonnage.*

La mauvaise reproductibilité de la méthode de dosage nous a conduit à étalonner le circuit analytique. Pour cela nous prélevons une quantité connue d'une solution d'un amino-acide (par exemple Isoleucine ou

Norleucine) pendant un temps déterminé. Les coefficients d'intégration obtenus nous permettent éventuellement d'introduire un facteur de correction.

Il est possible également d'effectuer un étalonnage « interne » en introduisant sur la colonne un ou deux amino-acides en quantité connue. Nous n'avons pas utilisé cette méthode. Par contre nous effectuons régulièrement une chromatographie standard pour tester le pouvoir résolutif de notre résine.

d) *Sensibilité.*

Les coefficients d'intégration obtenus (tableau 18) nous montrent que l'on peut facilement doser 0,1 μ mole de chaque acide aminé.

Théoriquement la limite de la sensibilité peut être abaissée, mais on s'expose alors à des erreurs importantes étant donné le manque de précision du dosage. La quantité maximum d'amino-acide que l'on peut doser est de l'ordre de la micromole. Si les quantités introduites sont supérieures, on s'expose alors à une mauvaise séparation au cours de la chromatographie.

e) *Autres causes d'erreurs.*

Hamilton a récemment signalé la contamination que pouvait provoquer un contact du mélange à chromatographier avec les doigts ([89]). Cette contamination est due principalement à l'introduction de traces de sueur et intéressé surtout la sérine, le glycocolle, l'acide aspartique, la citrulline et l'ornithine. Il est donc nécessaire d'opérer avec beaucoup de soin et d'éviter tout contact manuel du mélange soumis à la chromatographie.

E. — **Application aux impuretés protéiques contaminant les DNA.**

1. *Hydrolyse des protéines.*

Il est fort probable que les impuretés décelées par la réaction de Lowry sont de nature protéique ou peptidique. Il est donc impossible de réaliser une chromatographie directement sur un échantillon préalablement hydrolysé par le désoxyribonucléase I et la phosphodiestérase. Un hydrolyse chimique destinée à libérer les amino-acides constitutifs est nécessaire.

Nous ne considérerons dans ce paragraphe que le point de vue technique : hydrolyse des protéines et sort des amino-acides au cours de l'hydrolyse. La préparation des échantillons, l'isolement des protéines et les résultats obtenus seront présentés ultérieurement, dans le chapitre réservé aux expérimentations.

Technique.

Un échantillon de la protéine est mis en suspension dans une solution de ClH 6 N dans la proportion de 1 à 2 ml pour 3 à 5 mg de protéines (si la protéine est en solution, il est préférable de concentrer cette dernière afin de ne pas diluer la solution hydrolysante).

La suspension obtenue est transvasée dans une ampoule que l'on scelle sous vide de préférence.

L'hydrolyse est ensuite réalisée dans un autoclave à 118 °C, pendant 18 heures.

L'acide chlorhydrique est ensuite éliminé par plusieurs évaporations sous vide (5 ou 6) et le résidu est conservé sous vide sur de la potasse en pastilles afin de chasser les dernières traces d'acide chlorhydrique. Il est alors repris par 1 ml du tampon initial (pH 2,87) et mis sur la colonne en vue de la chromatographie.

2. *Dégradation des amino-acides au cours de l'hydrolyse.*

Plusieurs facteurs peuvent intervenir pour provoquer une dégradation de certains amino-acides au cours de l'hydrolyse chlorhydrique.

a) *Pureté des réactifs.*

Il est nécessaire d'utiliser un acide chlorhydrique très pur, si possible redistillé; en effet la décomposition de la thréonine et de la sérine varie, avec la pureté de l'acide utilisé ([163, 91]).

d'autre part l'acide cystéique qui apparaît sur de nombreux chromatogrammes est probablement dû à l'utilisation d'un acide contenant des traces de chlore libre ([55]). En général, la cystéine est dosée sous forme d'acide cystéique après oxydation de la protéine ([169]).

b) *Influence de la température.*

La température constitue avec le temps nécessaire à l'hydrolyse, une des variables les plus importantes et il n'est pas toujours très facile de la contrôler durant l'hydrolyse. C'est pourquoi peu de travaux font état de cette variable ([91]). En règle générale la décomposition croît avec la température. Néanmoins, pour obtenir une rupture des liaisons peptidiques, il est nécessaire d'opérer au moins à 110 °C.

c) *Influence du temps.*

Smith et Stockell ont étudié ce facteur en comparant les résultats obtenus après 20 heures et 70 heures d'hydrolyse de la carboxypeptidase ([177]) et de la papaïne ([178]). Ils ont constaté que, si le glycocolle, l'alanine, la tyrosine et la phénylalanine n'étaient pas affectés, par contre, la sérine, la thréonine, l'acide aspartique et la lysine étaient détruits progressivement au fur et à mesure de l'hydrolyse comme le montre la figure 36.

Ces résultats ont été retrouvés par d'autres auteurs ([163, 91]). On sait d'autre part que les liaisons peptidiques contractées par ces amino-acides sont rapidement hydrolysées ([166, 114]) et que la libération de leurs constituants est réalisée après une hydrolyse de 20 heures.

Par contre, les taux de valine et d'isoleucine augmentent constamment pendant les 70 premières heures de l'hydrolyse ([178]) car les liaisons peptidiques de ces amino-acides sont résistantes à l'hydrolyse.

Il est mentionné également dans la littérature une destruction

légère mais significative de l'acide glutamide ([178]) de la méthionine ([187]), de la tyrosine ([91]) de la proline et de l'arginine ([91]) et une destruction très importante de la cystéine ([178, 91, 187, 177]).

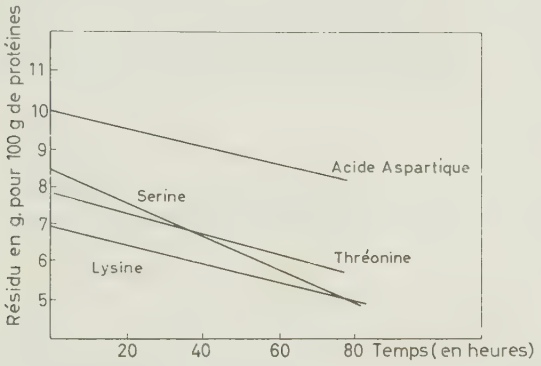


Fig. 36. — Influence du temps de l'Hydrolyse sur la décomposition de certains amino-acides [selon Smith et Stockell ([177])].

En résumé les résultats, parfois contradictoires sont unamines en ce qui concerne les acides aminés alcools et la cystéine.

d) *Influence des produits d'hydrolyse du DNA.*

Pour le problème très spécial qui nous intéressait, il était indispensable de connaître l'interférence éventuelle des produits d'hydrolyse du DNA sur le comportement des amino-acides au cours de l'hydrolyse. Certains travaux déjà publiés ont indiqué que le DNA présent dans le milieu réactionnel pouvait provoquer la dégradation de certains amino-acides. Là encore les plus touchés sont la thréonine et la sérine mais surtout la tyrosine ([74, 45]).

D'un autre côté, un travail très important de Hotchkiss a montré que les dérivés puriques et notamment l'adénine étaient transformés partiellement en glycocolle au cours d'une hydrolyse de 4 heures ([92]), par Cl H 6 N. Lindsay et collaborateurs ont repris cette étude et précisé l'importance de la transformation en fonction de la température et du temps de l'hydrolyse ([119]). Il ne nous a pas été possible de tenir compte du glycocolle dans les résultats chromatographiques présentés dans la suite de cette thèse puisque nous ne connaissions pas au départ la concentration en adénine de nos solutions.

e) *Cas du tryptophane.*

La détermination du tryptophane pose un problème particulier car cet amino-acide est très sensible à une hydrolyse acide. Cependant, lorsque l'opération est effectuée en tubes scellés, la destruction n'est pas complète et il peut apparaître 2 pics sur le chromatogramme. Nous n'avons jamais observé ce phénomène de doublement du pic. Par contre,

nous avons toujours obtenu la disparition du tryptophane dans nos chromatogrammes.

En conclusion, l'hydrolyse acide peut provoquer une perte de plusieurs amino-acides et notamment de la thréonine et de la sérine; nous n'avons cependant introduit aucun facteur de correction dans nos résultats car la chromatographie d'un mélange standard, dans nos conditions expérimentales, avant et après hydrolyse acide, ne nous a donné aucune différence importante.

V. — AUTRES TECHNIQUES UTILISÉES AU COURS DE CE TRAVAIL.

A. Dosage du ribose.

Nous avons utilisé la technique de Moule ([141]) basée sur la coloration que donne le ribose, en présence d'un acide concentré, combiné à l'orcinol (réaction de Bial). L'étalonnage est réalisé avec une solution de ribose de concentration connue.

Ce dosage a été entrepris sur les fractions obtenues après chromatographie des PR.DNA sur Dowex 50 × 2 (chapitre vi) et ne contenant pas de désoxyribose. Il nous a donc été possible de l'effectuer directement sans élimination préalable de ce sucre.

B. Dosage des amino-acides totaux.

Il a été effectué par utilisation de la méthode de Yemm et Cocking ([213]) utilisant la ninhydrine comme réactif indicateur. Les amino-acides sont préalablement libérés par hydrolyse alcaline (NaOH 7,5 N) de 2 heures à 100° et la réaction est réalisée sur cet hydrolysat neutralisé par CH_3COOH 5 N. L'étalonnage est réalisé avec une solution de glycocolle de concentration connue.

C. Chromatographies sur papier.

Nous avons été amenés à réaliser des chromatographies sur papier afin de vérifier la pureté des fractions obtenues après chromatographie des PR.DNA sur Dowex 50 × 2 (chapitre vi) ou afin d'identifier avec certitude quelques amino-acides. Dans ce dernier cas, les solutions sont préalablement déminéralisées par emploi d'une résine échangeuse de cations sous forme acide ([142]). La solution amenée à un volume de 10 ml est placée sur la colonne de résine et doit s'écouler lentement. Après lavage par 20 ml d'eau distillée destinée à éliminer les anions non retenus, les amino-acides sont élués avec 40 ml d'une solution d'ammonique normale tandis que les cations sont retenus sur l'échangeur. La plus grande partie des amino-acides est éluée avec le front de l'ammo-

niaque ([28]) mais pour effectuer une récupération totale, il faut recueillir un volume d'éluat plus important.

Les chromatographies ont été réalisées en migration ascendante de 24 heures sur papier Whatmann n° 3 MM dans les différents systèmes solvants suivants :

1)	*n* butanol	80 ml ([73])
	Acide acétique	20 ml
	Eau distillée	100 ml
2)	Acide isobutyrique	66 ml (*)
	Eau distillée	33 ml
	Ammoniaque	1 ml
3)	Acide isobutyrique	100 ml ([99])
	Ammoniaque N	60 ml
	EDTA sel disodique	1,6 g

Les chromatographies d'amino-acides ont été révélées par pulvérisation après un séchage de 24 heures à l'étuve pour éliminer l'ammoniaque ([75]), d'une solution de ninhydrine à 0,2 % dans l'éthanol et maintient 15 minutes à l'étuve à 60°.

Les chromatographies des fractions de PR.DNA (voir plus haut) ont été révélées :

par utilisation de la ninhydrine;

par formation d'un DNP-peptide ([143]) : on pulvérise sur le chromatogramme une solution acétonique à 3 % de fluorodinitrobenzène puis une solution aqueuse à 2 % de CO_3HNa. Après chauffage (15 minutes à 100 °C) le chromatogramme est exposé aux vapeurs d'acide chlorhydrique. Dans ces conditions, il se décolore sauf aux points où se trouvent des DNP-Peptides.

D. Techniques électrophorétiques.

1. *Electrophorèses sur papier.*

Nous avons utilisé la technique classiquement décrite pour réaliser l'électrophorèse des protéines sériques :

— migration du pôle négatif vers le pôle positif dans un tampon véronal sodique de pH 8,6 (force ionique 0,19);

— papier n° 2043 à Mgl, cuves elphor;

— coloration des bandes de papier par l'amido Schwartz et lavage par le méthanol acétique.

2. *Électrophorèses en gel d'amidon.*

A la suite de travaux de Smithies ([179]) concernant l'utilisation du gel d'amidon comme support en électrophorèse, nous avons réalisé les électrophorèses dans trois systèmes différents :

a) tampon véronal sodique (force ionique 0,19) de pH 8,6 identique à celui utilisé pour les électrophorèses sur papier;

(*) Pabst Laboratories, Circular OR 10, Milwaukee, Wisconsin.

b) tampon à l'acide borique (force ionique 0,03) de pH 8,4.

Dans ces deux tampons, les protéines migrent du pôle négatif vers le pôle positif.

c) tampon au lactate d'aluminium (force ionique 0,10) de pH 3,1 ([21]). Cette dernière technique a été mise en œuvre afin de déceler la présence éventuelle de protéines basiques (de type histone), dans les PR-DNA. La migration des protéines s'effectue, à la différence des 2 autres, du pôle positif vers le pôle négatif.

3. *Préparation des réactifs.*

a) Tampon véronal sodique pH 8,6 :

Véronal sodique	19,67	g
Acétate de sodium R.P.	13	—
ClH N	12	ml
H_2O q.s.p.	2 000	—

b) Tampon à l'acide borique pH 8,4 :

Acide borique	18,60	g
Soude N	60	ml
H_2O q.s.p.	1 000	—

c) Tampon au lactate d'aluminium pH 3,1 :

Lactate d'aluminium	5	g
H_2O	800	ml
Acide lactique q.s.p.	pH 3,1	
H_2O q.s.p.	1 000	ml

d) Préparation du gel d'amidon :

La concentration du gel en amidon est identique pour les trois systèmes et égale à 15 g d'amidon hydrolysé (*) pour 100 ml de tampon :

Composition des tampons servant à préparer le gel :

Tampon véronal sodique : identique à celui servant à remplir les cuves :

Tampon à l'acide borique :

Acide borique	1,26	g
NaOH N	12	ml
H_2O q.s.p.	1 000	—

Tampon au lactate d'aluminium :

Lactate d'aluminium	5	g
Urée	240	—
Acide lactique q.s.p.	pH 3,1	
H_2O q.s.p.	1 000	ml

Les plaques de gel sont ensuite colorées par l'amido-schwartz et lavées par une solution de méthanol acétique.

(*) Amidon hydrolysé Connaught.

E. **Détermination du tryptophane.**

Cet amino-acide, détruit au cours de l'hydrolyse acide a été déterminé sur certaines fractions obtenues après chromatographie des PR. DNA sur Dowex 50 × 2 (chapitre VI). Nous avons utilisé la méthode de Goodwin et Morton [77] basée sur le spectre d'absorption en milieu alcalin du tryptophane avec la formule suivante :

$$M = (0{,}263 \times K_{280} - 0{,}170 \times K_{294}) \times 10^{-3}$$

dérivée des travaux de Beaven et Holiday [12] où :

M = molécule de tryptophane par gramme de protéine.
K_{280} } coefficients d'extinction du mélange à analyser en solution
K_{294} } dans NaOH 0,1 N à 280 et 294 mμ.

F. **Préparation de noyaux isolés.**

Afin d'éliminer l'hypothèse d'une contamination cytoplasmique, nous avons été amenés à isoler des noyaux cellulaires. Nous avons utilisé la technique simple et rapide de Zalta [215] basée sur l'emploi d'agents tensioactifs. Les cellules libérées par homogénéisation, sont mises en contact d'abord avec une solution de nonylphénolpolyoxyéthylène à 6 mol d'oxyde d'éthylène puis avec une solution à 12 mol d'oxyde d'éthylène. Ces substances ont en effet une grande affinité pour les membranes cellulaires qu'elles lysent. Les noyaux ainsi libérés sont ensuite collectés par centrifugation douce. L'absence de toute contamination cytoplasmique est vérifiée au microscope.

CHAPITRE III

LES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE PRÉPARATION DU DNA ([7])

La partie essentielle de ce travail étant l'analyse des molécules protéiniques étroitement liées au DNA et extraites avec lui, il nous était nécessaire de vérifier si ces protéines variaient avec le mode de préparation du DNA. Dans ce but nous avons utilisé plusieurs méthodes de préparation.

Le principe des différentes méthodes de préparation est identique. Seule diffère la rupture de l'association naturelle acide nucléique-protéine et nous ne décrirons que celles utilisées au cours de ce travail.

La préparation du DNA à partir des tissus animaux comporte généralement les étapes suivantes :

A. Rupture des cellules.

Dans toutes nos expérimentations nous sommes partis d'un tissu animal particulièrement riche en DNA : le thymus de veau (environ 2,5 à 2,8 % de DNA).

Les organes sont prélevés, aussi aseptiquement que possible, dès l'abattage des animaux et immédiatement congelés dans la neige carbonique.

Les tissus animaux congelés sont ensuite réduits en fins morceaux et broyés dans un homogénéiseur à palettes en présence de carboglace. La poudre obtenue, qui peut être conservée plusieurs jours à — 80 °C sans altération du DNA, est décongelée dans 5 volumes d'une solution de ClNa 0,14 M, citrate de sodium 0,05 M. Le mélange est homogénéisé dans un broyeur type Turrax.

B. Elimination du RNA.

Elle repose sur la solubilité des ribonucléoprotéines (RNP) qui est différente de celle des désoxyribonucléoprotéines (DNP). En effet, les RNP sont solubles dans une solution de ClNa 0,14 M alors que les DNP y sont insolubles (elles sont par contre solubles dans les solutions salines très diluées ou de molarité supérieure à l'unité).

La suspension précédente est donc centrifugée (3 000 g 20 mn) et les surnageants contenant les RNP sont éliminés. Les culots sont ensuite remis en suspension et lavés plusieurs fois avec la même solution (ClNa 0,14 M — citrate de sodium 0,05 M). On admet que, dans ces conditions, 80 % au moins du RNA est éliminé, ce qui dans le cas du thymus, est suffisant, étant donné sa pauvreté relative en RNA.

C. Extraction des désoxyribonucléoprotéines.

Les DNP contenus dans les culots résultant des centrifugations précédentes sont alors mises en solution dans ClNa M ([129]). Cette force ionique élevée inhibe l'action des désoxyribonucléases éventuellement présentes (dans le cas présent, désoxyribonucléase II, essentiellement).

Cette solution, qui devient rapidement visqueuse, est agitée pendant plusieurs heures avant d'être déprotéinisée.

D. Déprotéinisation des solutions.

1. *Déprotéinisation par les sels.*

Cette technique a été mise au point par Signer et Schwander ([170]), ([173]) et repose sur la dissociation accentuée des DNP en milieu de force ionique élevée. La solution de DNP précédente est saturée en ClNa agitée et abandonnée plusieurs semaines en chambre froide. Après filtration sur une couche de célite, le DNA est précipité par l'alcool. Le rendement est bon mais la méthode est très longue.

2. *Déprotéinisation par les détergents.*

La solution de DNP en milieu ClNa 0,01 M (différence avec les autres techniques) est traitée à la température de la chambre froide et avec agitation constante par un détergent anionique. le dodécyl sulfate de sodium, à la concentration de 0,5 à 1 % ([101]). Le détergent semble agir en dissociant la nucléoprotéine soit par complexation des métaux, soit par combinaison électrostatique avec la protéine basique.

La suspension après l'ajustement de la solution à une concentration molaire en ClNa, est centrifugée et le DNA précipité par l'alcool à partir du surnageant.

3. *Déprotéinisation par le phénol.*

Cette méthode, largement utilisée par Kirby, est basée sur la nature des liaisons qui unissent les protéines au DNA, liaisons de type électrovalent et liaison de type chelate grâce à l'intervention d'un métal lié à un groupement carboxylique de la protéine ([104]).

Dans un mélange phénol-eau, le DNA est solubilisé dans la phase aqueuse en présence d'anions organiques (para amino salicylate, ben-

zoate, trichloracétate (etc...) ([104, 106, 105]) alors que le phénol joue probablement le rôle de solvant protéinique. Le pouvoir considérable du phénol pour extraire les protéines à partir de solutions aqueuses a d'ailleurs été démontré par Grassmann et Deffner ([80]). La déprotéinisation varie suivant l'organe dont on est parti ([106]) et suivant l'anion que l'on utilise ([104]).

Après centrifugation de la solution et extraction du phénol par des lavages successifs à l'éther, le DNA est purifié par précipitation alcoolique et traitement par la RNase.

4. Déprotéinisation enzymatique.

Parmi les différentes techniques préconisées, nous avons retenu celle de Aubin et coll. utilisant la papaïne ([8]).

Les DNP en solution dans ClNa 0,14 M citrate de Na 0,05 M sont traités pendant 16 heures à 45 °C par un mélange papaïne-acide cholique. Ce dernier agit probablement en favorisant l'éclatement des cellules et en abaissant la tension superficielle du milieu. Après une filtration rapide sur gaze, une deuxième hydrolyse est effectuée pendant 4 heures. Après filtration sur une couche de célite, le DNA est ensuite précipité par l'alcool.

E. **Précipitation du DNA.**

Après action du ou des agents déprotéinisants, le DNA est débarrassé d'une grande partie de ses contaminants par filtration ou centrifugation comme nous venons de le voir. Le DNA est ensuite purifié par précipitation alcoolique. Cette précipitation est généralement effectuée par addition d'un volume égal d'éthanol à la solution de DNA qui est rendue préalablement molaire en ClNa.

La précipitation du DNA en fibres est immédiate.

Les fibres sont ensuite déshydratées par lavages avec des solutions alcooliques de titre croissant, le rôle de l'alcool étant de retirer l'eau d'imbibition du DNA sans toucher à l'eau de constitution.

La conservation peut être réalisée soit en fibres, soit en solution, le DNA étant dans ce cas, immédiatement redissous dans ClNa 0,01 M.

F. **Préparation d'un DNA à partir de cellules d'ascite d'Ehrlich.**

L'ascite d'Ehrlich est entretenue sur des souris C_{57} black par passage tous les huit jours de 0,25 ml par voie intra-péritonéale.

Le DNA est extrait 4 à 5 jours après l'inoculation. Les cellules après leur prélèvement sont diluées au demi avec du sérum physiologique citraté et congelées ensuite dans l'alcool à — 80 °C. Cette congélation permet une conservation de plusieurs jours et facilite également l'extraction du DNA par éclatement des cellules. Le DNA est ensuite extrait par la méthode de Kirby ([104]).

Le tableau 19 contient la liste des différents DNA utilisés au cours de ce travail. Il s'agit dans tous les cas de solutions faites avec ClNa 0,14 M. Les DNA seront toujours par la suite appelés par leur numéro de code, figurant dans la 1re colonne.

TABLEAU 19

Liste des différents DNA utilisés au cours de ce travail.

N° Code	Tissu d'origine	Méthode de préparation	Concentration en DNA de la solution utilisée (mg/ml) (méthode de Dischburton)	Taux de protéines pourcentage (méthode de Lowry)
A	thymus de veau	Aubin et col. [8]	1,16	0,53
B	—	—	1,18	1,10
C	—	—	1,45	0,40
D	—	—	1,92	2,70
E	—	Signer et col. [173]	1,77	0,50
F	—	—	2,58	0,20
G	—	—	2,40	0,90
H	—	Kay et col. [101]	2,52	3,70
J	—	—	4,15	0,40
K	—	Kirby [104]	2,04	2,50
L	—	Signer et col. [173]	0,81	0,80
M	—	—	4,95	0,70
N	—	Kirby [104]	0,84	7,80
P	—	Signer et col. [173]	3,34	3,10
Q	—	—	1,40	0,76
R	—	—	1,32	9,50
S	—	—	2,84	3,60
T	—	—	2,94	1,90
U	—	Kay et col. [101]	0,80	2,50
V	Cellules d'Ascite d'Ehrlich	Kirby [104]	0,73	6,00
W	noyaux isolés de thymus de veau	Signer et col. [173]	3,26	0,44
X	thymus de veau	—	2,56	0,44
Y	—	Kay et col. [101]	1,88	1,20

G. Variations du taux des protéines et leur intéret.

Nous pouvons remarquer sur le tableau 19 les grandes variations du taux des PR.DNA dans les différents échantillons. Ces variations ne sont pas dues au hasard mais ont été volontairement réalisées par

une déprotéinisation plus ou moins poussée. Nous voulions en effet étudier la composition en amino-acides des PR.DNA en fonction du taux de protéines.

Cette étude est, à notre sens, très importante car elle permet de déterminer « l'affinité » des différents amino-acides pour le DNA. Il est bien évident que si la concentration d'un amino-acide A augmente lorsque diminue le taux des protéines, cet amino-acide est lié très fortement au DNA et intervient peut-être d'une façon importante dans telle ou telle fonction biologique du DNA.

Inversement, si la concentration d'un autre amino-acide B diminue avec le taux de protéines, cet amino-acide n'a que peu d'affinités pour le DNA et n'est probablement qu'un artefact de préparation.

CHAPITRE IV

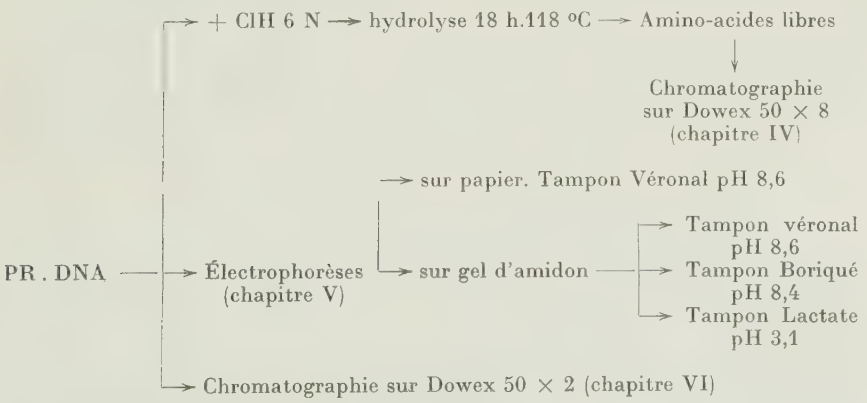
ISOLEMENT DES PR.DNA ET LEUR ANALYSE GLOBALE EN AMINO-ACIDES

Nous allons examiner dans ce chapitre les résultats fournis par la chromatographie sur colonne et concernant la composition en amino-acides des PR.DNA. Quelques travaux ont déjà été effectués dans ce domaine (*) mais, dans tous les cas cités, le DNA est directement hydrolysé par ClH 6 N. Étant donné les inconvénients présentés par cette technique (l'hydrolyse chlorhydrique fournit directement les amino-acides, détruisant toutes les liaisons peptidiques ainsi que les liaisons DNA-protéines sans en permettre l'étude), nous avons essayé de mettre au point une méthode permettant d'éliminer une partie du DNA avant que ne soit réalisée l'hydrolyse chlorhydrique. Cette technique présente surtout l'avantage de ne pas détruire les liaisons DNA-protéines associées, et ainsi de permettre peut-être ultérieurement l'analyse de ces liaisons et l'étude de l'enchaînement des amino-acides identifiés.

Le tableau 20 résume d'ailleurs les différentes manipulations que nous avons effectuées sur les résidus protéiques.

TABLEAU 20

Différentes manipulations effectuées sur les PR.DNA.



(*) Voir chapitre I, 4e paragraphe.

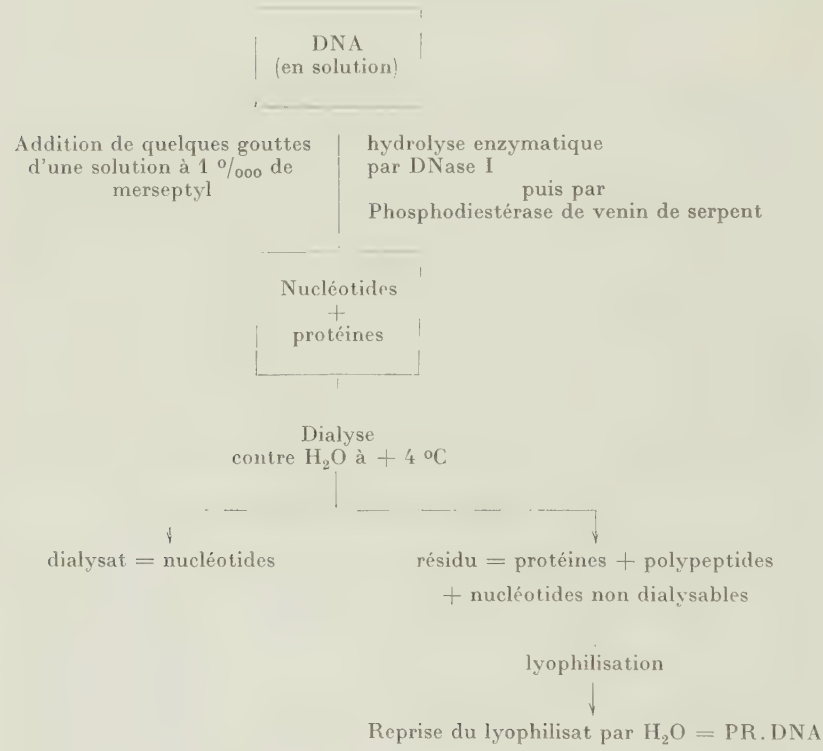
A. Technique d'isolement des PR.DNA.

1. *Description de la méthode.*

Elle est résumée dans le tableau 21.

TABLEAU 21

Extraction des PR.DNA.



a) Hydrolyse enzymatique.

Cette opération a pour but de dégrader le DNA jusqu'en ses éléments constitutifs : les nucléotides

Échantillon de DNA à analyser (contenant de 1 à 3 mg de DNA par ml)	20 à 30 ml
SO_4Mg 0,3 M	2 à 3 ml
Tampon tris 0,4 M pH 7,8	3 à 4,5 ml

Mélanger soigneusement en évitant tout contact avec les mains [présence d'amino-acides libres ([89])].

Solution de Dnase I à 200 µg/ml (*)	0,10 à 0,30 ml
Agiter et laisser 10 heures à 37°.	
Solution de phosphodiestérase de venin de serpent à 200 µg/ml (**)	0,10 à 0,30 ml
Agiter et laisser 10 heures à 37°.	

La quantité de DNA soumis à l'analyse varie en effet avec la concentration de la solution et le taux de protéines De toute façon, la quantité des autres réactifs nécessaires à l'hydrolyse varie dans les mêmes proportions. Les enzymes sont ajoutés en excès, dans la proportion de 1 µg/mg de DNA.

La DNase I est une 5′ phosphodiestérase. Nous savons grâce à l'électrotitration qu'elle hydrolyse 25 % environ des liaisons ([112, 120]) : il prend naissance 1 % de mononucléotides, 17 % de dinucléotides et des oligonucléotides de poids moléculaire plus élevé, tous terminés par un groupe 5′ phosphate ([175, 175 *bis*, 158, 69, 118, 115]). L'étude des produits d'hydrolyse par Sinsheimer ([174]) montre que la séquence base purique-base pyrimidique (à l'exception de la séquence guanine-cytosine) est préférentiellement attaquée par cet enzyme. Des conclusions identiques sont rapportées par Privat de Garilhe ([161]) et par Potter et coll. ([159]). Cette spécificité est certaine bien que préférentielle seulement. Elle peut sans doute évoluer au cours de la réaction : au début le nombre de liaisons coupées étant faible, les liaisons Pu — Py sont seules attaquées et en fin de réaction, l'enzyme pourrait hydrolyser d'autres liaisons jusqu'à en atteindre environ 25 %. Nous avons donc ajouté à notre milieu de réaction une phosphodiestérase de venin de serpent qui catalyse la libération successive de mononucléotides en bout de chaîne.

Cette hydrolyse est réalisée en présence de quelques gouttes d'une solution au dix millième de merseptyl destinée à éviter toute contamination bactérienne susceptible de provoquer l'hydrolyse des protéines.

b) Elimination des nucléotides.

L'élimination des nucléotides formés au cours de l'hydrolyse enzymatique est réalisée en chambre froide à + 4 °C par dialyse en continu de l'échantillon (qui est recyclé) contre de l'eau distillée constamment renouvelée (fig. 37). Elle dure 24 heures et nécessite environ 1 500 ml d'eau distillée.

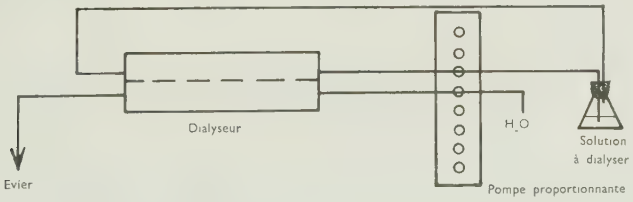


Fig. 37. — Elimination des nucléotides par Dialyse.

(*) Dnase I cristallisée Worthington Biochem. corp.
(**) Produit Mann Res. Lab.

Pour essayer de déterminer l'importance de cette élimination, nous avons effectué des dosages de désoxyribose avant et après dialyse. Nous avons obtenu les résultats suivants (tableau 22).

TABLEAU 22

Pourcentage de dialyse (**) des nucléotides libérés par hydrolyse enzymatique.

(DNase I + phosphodiestérase de venin de serpent)

Échantillons de DNA analysés	Pourcentage de dialyse
M	38,7 %
P	16,5
Q	23
R	18
T	13,7
W	10
X	72
Témoin (*)	62,5

(*) Le témoin est constitué par une solution de nucléotides (500 µg de chaque mononucléotide/ml).

Ce tableau montre la grande variabilité du pourcentage de dialyse des nucléotides libérés. Cette variabilité est peut-être tout simplement due à l'utilisation de membranes de dialyse différentes d'une manipulation à une autre. Craig [46] admet en effet qu'une membrane de cellophane mouillée constitue un gel et qu'une certaine marge dans le diamètre des pores doit être envisagée. Il nous montre d'autre part que ce pourcentage est faible.

Quant aux protéines qui ne sont pas attaquées à ce stade de l'opération, elles ne dialysent théoriquement pas. Nous avons cependant vérifié l'éventualité d'une dialyse en appliquant la technique de Lowry avant et après dialyse sur l'échantillon de DNA T (solution contenant 2,94 mg/ml de DNA et 1,9 % de protéines).

PR. DNA déterminé avant dialyse ..... 53,7 µg/ml
PR. DNA déterminé après dialyse ..... 44,0 µg/ml

soit un pourcentage de dialyse de ..... 18,1 %

Ce pourcentage n'est pas négligeable et correspond à priori à la libération au cours de l'hydrolyse ou à la présence avant cette hydrolyse d'amino-acides libres.

(**) Déterminé par des dosages de désoxyribose (Burton) avant et après dialyse

c) Concentration des protéines.

Le résidu protéique, est alors concentré par lyophilisation. La poudre obtenue est reprise ensuite par 1 ml d'eau distillée.

La moitié de ce mélange, soit 0,5 ml est conservée pour effectuer les migrations électrophorétiques que nous décrirons ultérieurement.

d) Hydrolyse chlorhydrique.

Elle est effectuée en tube scellé suivant la technique précédemment décrite (page 61). Les amino-acides ainsi libérés sont ensuite chromatographiés sur une colonne de Dowex 50 × 8.

2. *Particularité de cette méthode.*

La différence essentielle avec les méthodes d'analyse des acides aminés déjà décrites dans la littérature réside dans l'attaque enzymatique du DNA et dans la dialyse des nucléotides ainsi formés. Si nous n'éliminons de cette manière qu'une faible partie de DNA initialement présent et si par conséquent notre technique n'offre, à ce point de vue, que peu d'avantages sur les techniques déjà décrites dans la littérature, nous pouvons par contre étudier la nature des liaisons qui relient des amino-acides d'une part entre eux (protéines ou polypeptides) et d'autre part au DNA.

Elle présente par contre quelques difficultés :

— d'une part le temps nécessaire à sa réalisation : les différentes manipulations permettant l'obtention d'un mélange d'amino-acides libres demandent plusieurs jours.

— d'autre part la prise d'essai soumise en dernier lieu à l'analyse chromatographique est très faible puisque nous devons déterminer la composition d'un mélange contenant parfois moins de 100 µg de protéines.

3. *Précautions nécessaires.*

Le but de cette méthode est d'isoler des protéines (ou des polypeptides). Il était donc nécessaire d'éviter toute activité protéolytique susceptible de provoquer l'hydrolyse des protéines et par conséquent l'élimination au cours de la dialyse des petits peptides et des amino-acides formés.

Parmi les différentes causes susceptibles de provoquer une protéolyse, nous avons retenu :

a) une protéolyse due à l'utilisation de préparations enzymatiques impures (DNase I et phosphodiestérase).

b) une protéolyse due à la présence de bactéries dans le milieu réactionnel.

Nous avons donc vérifié sur plaque de gélatine et dans les mêmes conditions de concentration, de pH et de température l'absence d'activité protéolytique pour les enzymes utilisés dans nos expériences. Les résultats obtenus ont été négatifs.

Nous avons donc vérifié sur plaque de gélatine et dans les mêmes conditions de concentration, de pH et de température l'absence de bactéries dans le milieu réactionnel sur plusieurs échantillons de DNA. Tous les résultats ont été négatifs à une exception près (il s'agissait du lot de DNA B).

Cette protéolyse accidentelle fort génante risquait de remettre en question nos résultats. Pour éviter de semblables inconvénients nous avons alors introduit dans nos mélanges, dés le début de l'opération quelques gouttes d'une solution de merseptyl aux dix millième.

B. Composition en amino-acides des PR.DNA.

1. *Technique.*

Le mode opératoire a été détaillé précédemment : rappelons simplement que les amino-acides sont déterminés par chromatographie sur colonne de Dowex 50 × 8. La figure 38 montre un exemple de chromatographie obtenue avec l'échantillon de DNA B, après introduction sur la colonne de 100 µg de protéines.

2. *Caractéristiques de l'analyse chromatographique* (tableau 23).

Les analyses chromatographiques ont été réalisées à partir de 9 échantillons de DNA préparés selon les différentes méthodes décrites dans le chapitre III.

TABLEAU 23

Quantité de protéines soumises a l'analyse chromatographique.

Échantillons de DNA analysés	Taux de protéines	Prise d'essai de la solution de DNA	DNA initialement contenu dans la prise d'essai (Burton)	Protéines (Lowry)	
				totales dans la prise d'essai	chromatographiées après hydrolyse (ClH 6 N)
B	1,10 %	30 ml	35,4 mg	390 µg	100 µg
C	0,40	20	29,0	115	45
D	2,70	40	76,8	2 075	1 000
E	0,50	30	53,1	265	110
F	0,20	30	77,4	155	64
G	0,90	30	72,0	650	250
H	3,70	40	100,8	3 730	1 200
J	0,40	40	166,0	660	330
K	2,50	40	81,6	2 040	1 000

N.B. La différence importante entre les protéines totales et les protéines chromatographiées est due à la conservation d'une partie de la prise d'essai pour effectuer les électrophorèses sur divers supports (chap. v).

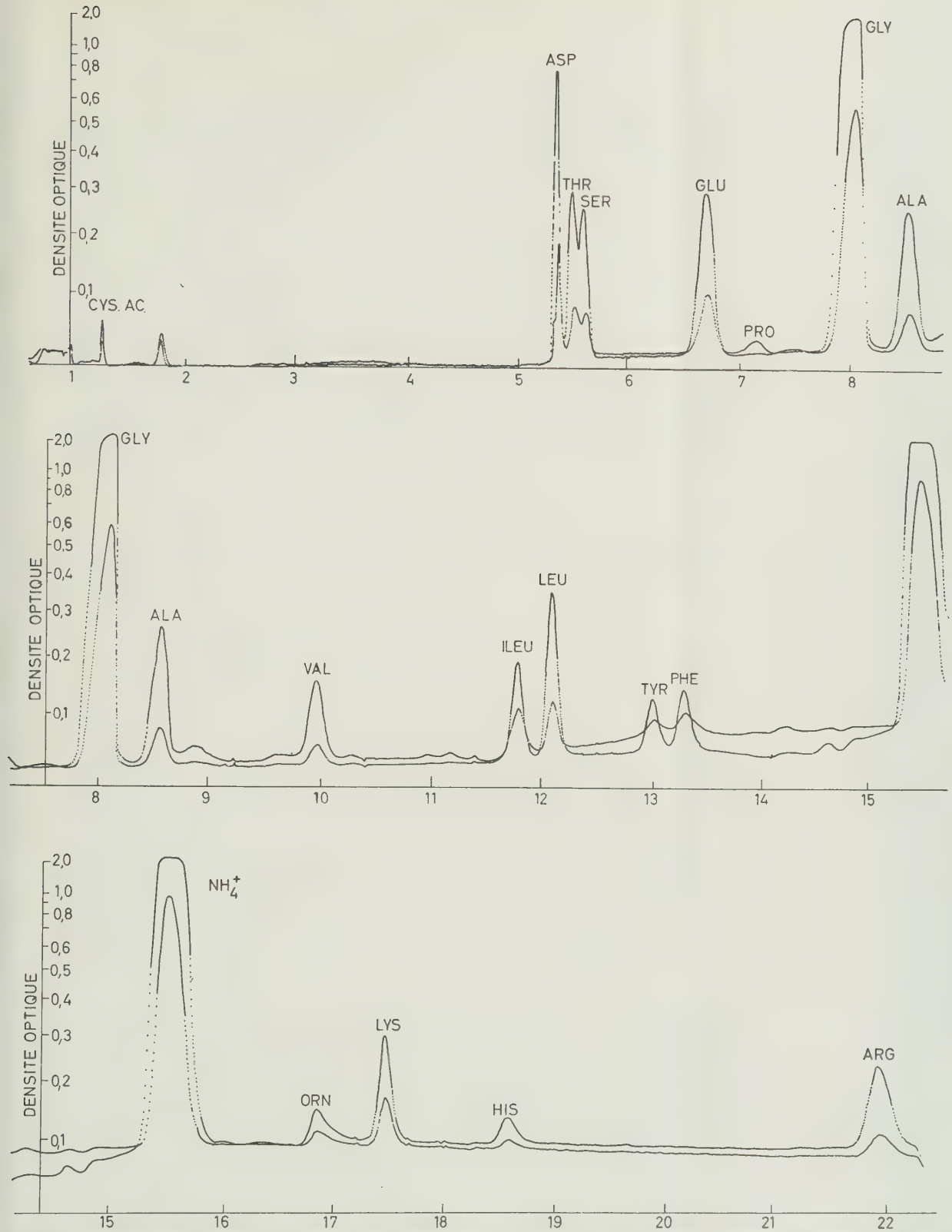


FIG. 38. — Enregistrement d'une chromatographie sur Dowex 50 × 8 des PR. DNA isolés à partir de l'échantillon de DNA B, après hydrolyse par ClH 6N, 118°, 18 h. Quantités de protéines introduites (technique de LOWRY) = 100 µg.

Ce tableau montre que les taux de protéines des échantillons de DNA utilisés sont très variables depuis 0,20 % (F) jusqu'à 3,70 % (H). Ce grand étalement des concentrations a été volontairement réalisé, comme nous l'avons déjà dit (p. 71). Nous voulions déterminer, en faisant varier le taux des protéines totales, « l'affinité » des différents amino-acides pour le DNA.

Nous pouvons également observer des variations importantes dans les quantités de protéines introduites sur la colonne de Dowex 50 × 8, après hydrolyse chlorhydrique; dans certains échantillons (lots D, H et K) cette quantité est élevée. En fait, nous avons voulu vérifier que la discordance parfois constatée dans certains résultats n'était pas tout simplement due à l'introduction sur la colonne de très faibles quantités de protéines (cas des lots C et F), ce qui aurait pu entraîner des erreurs dans l'estimation de la surface des pics du chromatogramme. Il n'en est rien et nous n'avons pas obtenu de différences entre un chromatogramme réalisé avec une concentration élevée de protéines et un chromatogramme réalisé avec des quantités plus faibles.

3. *Résultats obtenus.*

Les tableaux 24, 25 et 26, dont les valeurs sont reportés sur les figures 39 à 47 reproduisent les résultats que nous avons obtenus avec les DNA préparés :

— par une méthode enzymatique;
— par une méthode de protéinisation par les sels;
— par une méthode au détergent;
— par une méthode au phénol.

Expression des résultats.

Toutes les valeurs sont exprimées en micromole pour 100 micromoles d'amino-acides récupérés. Pour cela, nous avons transformé la surface des pics obtenus en micromole de l'amino-acide correspondant, en nous basant sur la surface de pics obtenus avec un mélange standard d'amino-acides, de concentration connue. Nous avons ensuite fait la somme des micromoles analysées et exprimé les amino-acides en pourcentage, en fonction de cette somme. La transformation de la surface des pics en micromole permet de tenir compte du pouvoir de réaction différent de chaque amino-acide vis-à-vis de la nihydrine.

Il n'est pas tenu compte du glycocolle puisque la dialyse n'éliminait pas tous les nucléotides formés au cours de l'hydrolyse enzymatique.

D'autre part les enzymes que nous ajoutons (DNase I et phosphodiestérase de venin de serpent) ne dialysent pas non plus. Il était donc essentiel de déterminer leurs amino-acides constitutifs pour pouvoir les soustraire du résultat final. Nous avons donc réalisé une chromatographie de ces enzymes seuls dans nos conditions expérimentales (après dialyse et hydrolyse chlorhydrique) pour déterminer l'importance de

TABLEAU 24

AMINO ACIDES CONSTITUTIFS DES PR.DNA OBTENUS A PARTIR DE DNA PRÉPARÉS PAR LA MÉTHODE ENZYMATIQUE DE AUBIN ET COLL. [8].

(Les résultats sont exprimés en moles pour 100 moles analysées).

	Amino-acides	DNA n° B	DNA n° C	DNA n° D
A.A. Acides	ASP	8,7	11,5	9,5
	GLU	12,7	11,7	12,9
	ALA	8,8	6,2	9,3
	VAL	5,3	4,3	7,0
	LEU	10,4	6,5	10,8
	ILEU	7,0	4,3	6,9
	PHE	3,9	6,0	3,9
	TYR	3,2	6,7	3,1
	SER	7,0	12,0	6,3
	THR	8,6	5,7	6,9
	PRO	2,7	traces	2,4
	MET	traces	—	traces
	CYS	—	—	1,8
A.A. Basiques	ARG	10,0	7,7	10,1
	HIS	2,5	5,5	2,1
	LYS	6,1	6,9	5,7
	ORN-like	2,3	3,6	1,0
	X	0,6	1,4	0,4
	A.A. basiques / A.A. acides	# 1	# 1	0,8
	Taux de protéines du lot de DNA	1,10 %	0,40 %	2,7 %
	Figures correspondantes	39	40	41

TABLEAU 25

Amino acides constitutifs des PR.DNA obtenus a partir de DNA préparés par la méthode de déprotéinisation par les sels de Signer [173].

(Les résultats sont exprimés en moles pour 100 moles analysées).

	Amino-acides	DNA n° E	DNA n° F	DNA n° G
A.A. Acides	ASP	10,5	9,4	10,2
	GLU	11,4	10,6	8,8
	ALA	8,1	10,2	12,6
	VAL	4,7	5,5	4,5
	LEU	8,4	7,9	7,0
	ILEU	5,1	7,5	5,6
	PHE	3,8	3,0	2,6
	TYR	2,5	2,8	2,1
	SER	8,5	12,7	11,9
	THR	5,1	4,9	5,5
	PRO	traces	—	traces
	MET	2,0	traces	1,1
	CYS	—	—	—
A.A. basiques	ARG	5,8	4,6	4,3
	HIS	5,6	4,5	6,0
	LYS	7,3	5,7	7,2
	ORN-like	9,2	6,0	6,6
	X	2,0	4,3	3,9
	A.A. basiques / A.A. acides	1,2	1,0	1,2
	Taux de protéines du lot de DNA	0,5 %	0,2 %	0,9 %
	Figures correspondantes	42	43	44

TABLEAU 26

Amino acides constitutifs des PR.DNA obtenus a partir de DNA préparés

— par la méthode au détergent de Kay [101]
— par la méthode au phénol de Kirby [104]

(Les résultats sont exprimés en moles pour 100 moles analysées).

	Amino-acides	DNA n° H (détergent)	DNA n° J (détergent)	DNA n° K (phénol)
A.A. Acides	ASP	9,7	9,9	12,1
	GLU	11,9	12,4	16,4
	ALA	10,3	8,0	8,6
	VAL	5,4	5,1	4,9
	LEU	10,2	9,4	8,8
	ILEU	5,4	5,0	4,6
	PHE	3,8	3,6	5,9
	TYR	3,0	2,6	3,0
	SER	7,7	10,7	8,0
	THR	6,8	5,5	6,1
	PRO	5,5	3,1	2,9
	MET	0,5	0,9	0,9
	CYS	0,5	—	traces
A.A. basiques	ARG	6,1	6,7	6,0
	HIS	2,7	2,2	2,6
	LYS	9,0	7,2	7,2
	ORN-like	0,9	3,4	1,5
	X	0,5	4,1	0,4
	A.A. basiques / A.A. acides	0,9	0,9	0,6
	Taux de protéines du lot de DNA	3,7 %	0,4 %	2,5 %
	Figures correspondantes	45	46	47

Fig. 39. — Composition en Amino-Acides (rapport $\frac{\text{A.A. Basiques}}{\text{A.A. acides}} \# 1$; richesse en Glu, Leu, Ileu, Thr, Arg) des PR-DNA de l'échantillon de DNA nº B (- - -) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) [Morowitz [140]].
n.d. Amino-Acide non déterminé.
Taux de protéines du lot B : 1,10 %.
Met : Traces 1/2 Cys = 0.

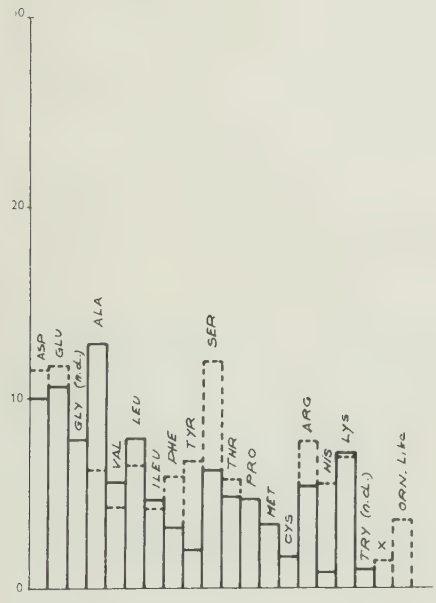


Fig. 40. — Composition en Amino-Acides (rapport $\frac{\text{A.A. Basiques}}{\text{A.A. acidess}} \# 1$; richesse en Asp, Glu, Tyr, Ser, Arg, His; pauvre en Ala) des PR-DNA de l'échantillon de DNA nº C (- - -) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) [Morowitz [140]].
n.d. Amino-Acides non déterminé.
Taux de protéines du lot C : 0,40 %.
Pro : Traces, Met 1/2Cys = 0.

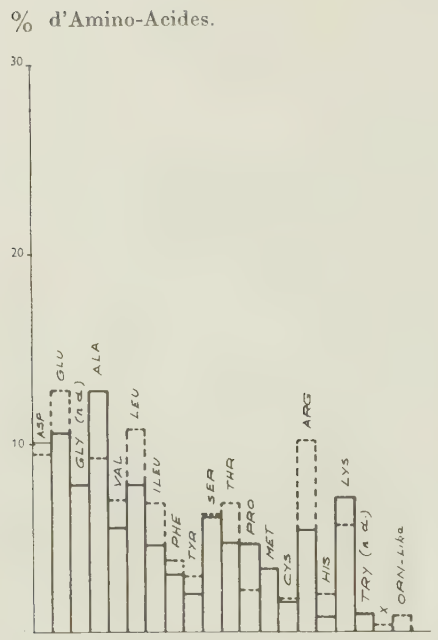


FIG. 41. — Composition en Amino-Acides (rapport $\frac{\text{A.A. Basiques}}{\text{A.A. acides}} = 0{,}8$; riche en Glu, Leu, Ileu, Arg) des PR-DNA de l'échantillon de DNA n° D (- - -) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) [Morowitz (140)].
n.d. Amino-Acide non déterminé.
Taux de protéines du lot D : 2,7 %.
Met : Traces.

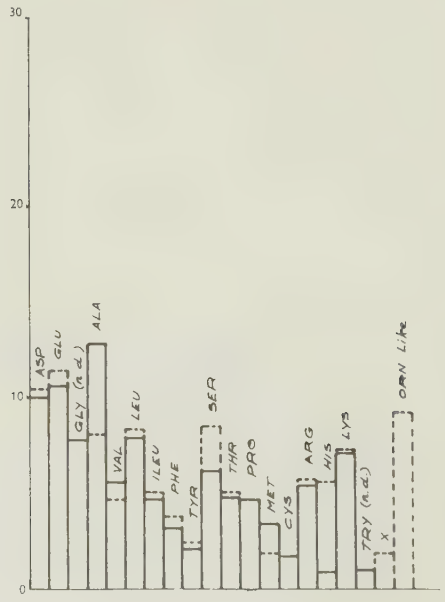


FIG. 42. — Composition en Amino-Acides (rapport $\frac{\text{A.A. Basiques}}{\text{A.A. acides}} = 1{,}2$; riche en Asp, Glu, Ser, His; pauvre en Ala) des PR-DNA de l'échantillon de DNA n° E (- - -) comparativement à une protéine normale d'E. Coli ( ) [Morowitz (140)].
n.d. Amino-Acide non déterminé.
Taux de protéines du lot E : 0,5 %.
Pro : Traces 1/2 Cys : 0.

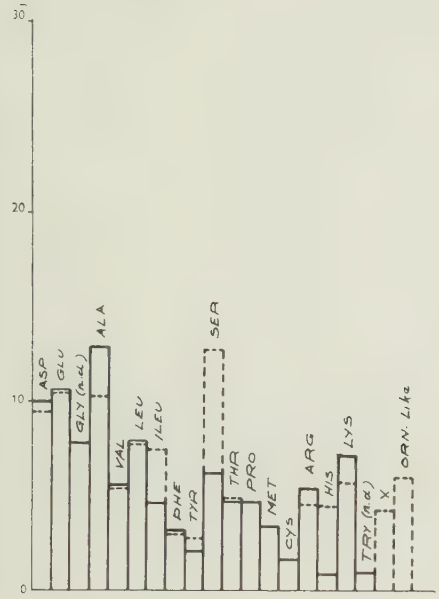


FIG. 43. — Composition en Amino-Acides (rapport $\frac{\text{A.A. Basiques}}{\text{A.A. acides}} = 1$; riche en Glu, Ileu, Ser, His.) des PR-DNA de l'échantillon de DNA n° F (- - -) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) [Morowitz [140]].
n.d. Amino-Acide non déterminé.
Taux de protéines du lot F = 0,2 %.
Pro 1/2 Cys = 0.
Met : Traces.

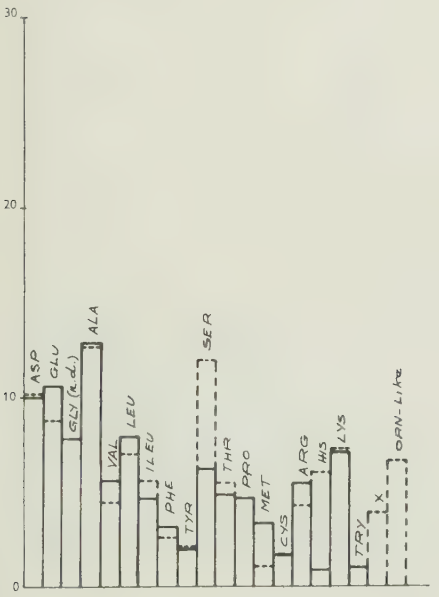


FIG. 44. — Composition en Amino-Acides (rapport $\frac{\text{A.A. Basiques}}{\text{A.A. acides}} = 1{,}2$; riche en Asp, Ser, His.) des PR-DNA de l'échantillon de DNA n° G (- - -) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) [Morowitz [140]].
n.d. Amino-Acide non déterminé.
Taux de protéines du lot G = 0,9 %.
1/2 Cys = 0.
Pro : Traces.

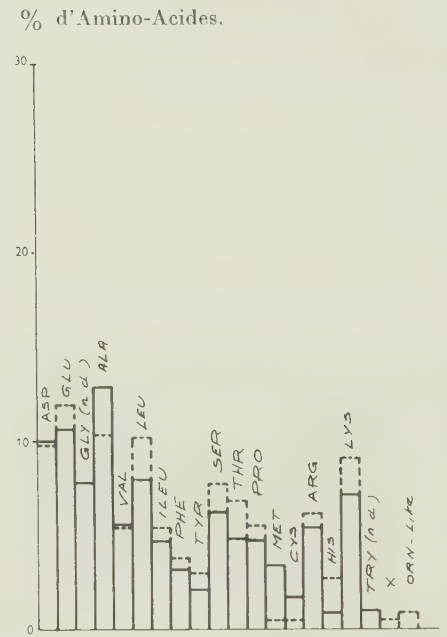


FIG. 45. — Composition en Amino-Acides (rapport $\frac{\text{A.A. Basiques}}{\text{A.A. acides}} = 0{,}9$; riche en Glu, Leu, Ser, Thr, His, Lys.) des PR-DNA de l'échantillon de DNA nº H (- - -) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) [Morowitz [140]].
n.d. Amino-Acide non déterminé.
Taux de protéines du lot H = 3,7 %.

FIG. 46. — Composition en Amino-Acides (rapport $\frac{\text{A.A. basiques}}{\text{A.A. acides}} = 0{,}9$; riche en Glu, Leu, Ser, Arg; pauvre en Ala) des PR-DNA de l'échantillon de DNA nº J (- - -) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) [Morowitz [140]].
n.d. Amino-Acide non déterminé.
Taux de protéines du lot J = 0,4 %.
1/2 Cys = 0.

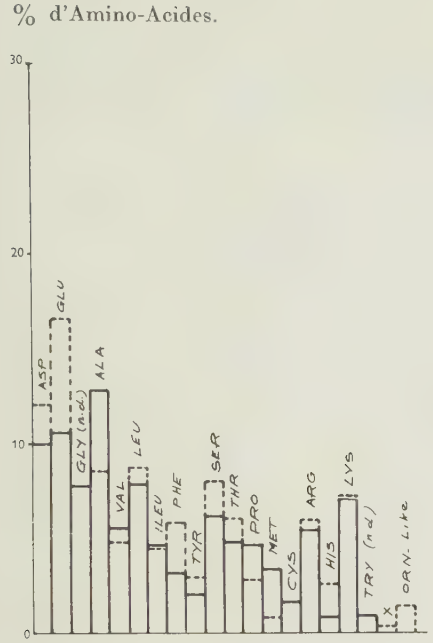


FIG. 47. — Composition en Amino-Acides (rapport $\frac{\text{A.A. basiques}}{\text{A.A. acides}} = 0{,}6$; riche en Asp, Glu, Ser, Thr, His; pauvre en Ala) des PR-DNA de l'échantillon de DNA n° K (- - -) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) [Morowitz [140]].
n.d. Amino-Acide non déterminé.
Taux de protéines du lot K : 2,5 %.
1/2 Cys : Traces.

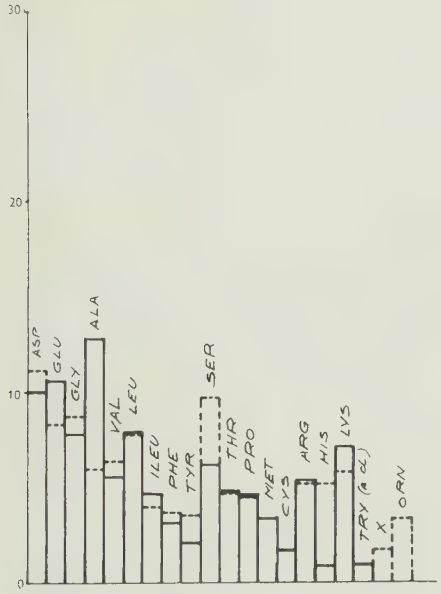


FIG. 48. — Composition en Amino-Acides (Met : Traces) d'un mélange DNAse I + Phosphodiesterase de venin de serpent (p.e.) (- - -) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) [Morowitz [140]].
n.d. Amino-Acide non déterminé.

cette surcharge. Les résultats sont mentionnés sur le tableau 27 et la figure 48. Ils sont également exprimés en micromole pour 100 micromoles analysées. Toutes les valeurs que nous présentons ont été corrigées en fonction de la quantité d'enzymes introduites et représentent donc bien la composition en amino-acides des PR.DNA.

TABLEAU 27

Amino acides constitutifs d'un mélange (à parties égales) DNase I + phosphodiestérase de venin de serpent.

(Les résultats sont exprimés en moles pour 100 moles analysées).

Amino-acides	Mélange { DNase I / Phosphodiestérase
ASP	11,1
GLU	8,3
GLY	8,7
ALA	6,0
VAL	6,4
LEU	7,8
ILEU	4,0
PHE	3,7
TYR	3,6
SER	9,7
THR	4,8
PRO	4,5
MET	traces
CYS	—
ARG	5,2
HIS	5,2
LYS	5,8
ORN-like	3,4
X	1,8

4. *Discussion.*

a) Variations des amino-acides en fonction du taux des protéines.

Nous pouvons classer les amino-acides en deux catégories :

— ceux dont le taux est constant et indépendant du taux des PR.DNA.

— ceux dont le taux varie avec celui des PR.DNA.

i : *Amino acides à taux constant.*

Ce sont :

— les acides aminés dicarboxyliques : acide aspartique et acide glutamique (fig. 49 et 50) qui représentent 19 à 28 % du total.

— La valine dont le taux se situe toujours aux alentours de 5 % (fig. 51).

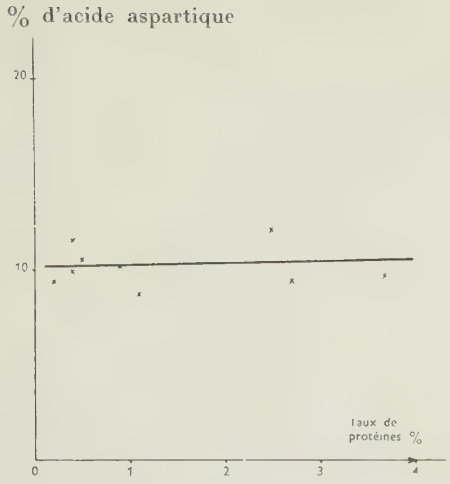


Fig. 49. — Variation de **l'Acide Aspartique** en fonction du taux de protéines des échantillons de DNA.

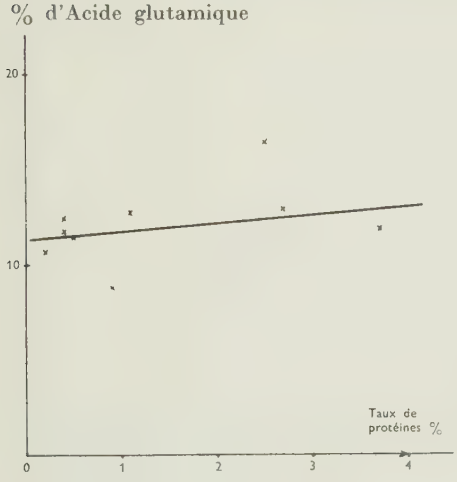


Fig. 50. — Variation de **l'Acide glutamique** en fonction du taux de protéines des échantillons de DNA.

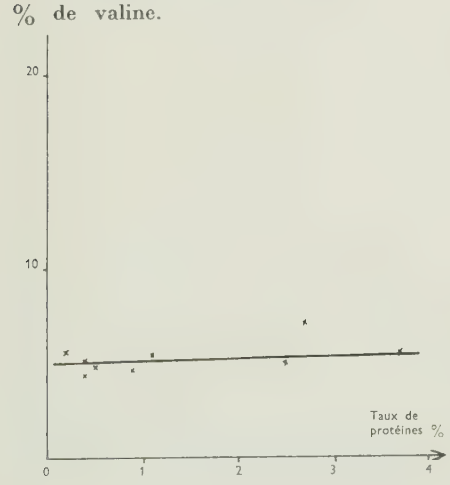


Fig. 51. — Variation de la **Valine** en fonction du taux de protéines des échantillons de DNA.

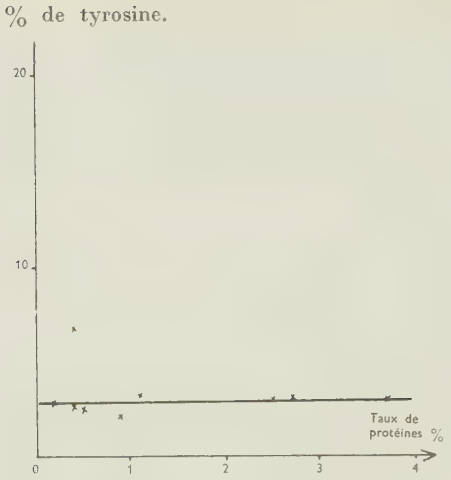


Fig. 52. — Variation de la **Tyrosine** en fonction du taux de protéines des échantillons de DNA.

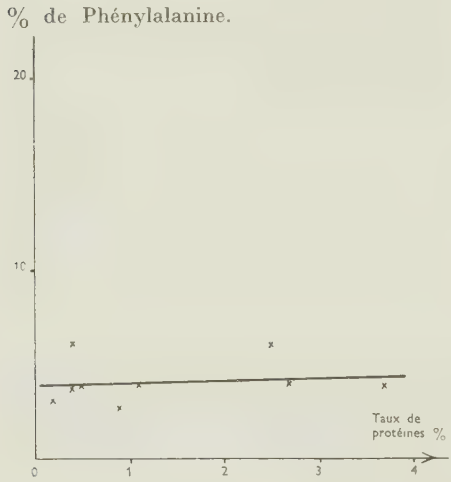


Fig. 53. — Variation de la **Phénylalanine** en fonction du taux de protéines des échantillons de DNA.

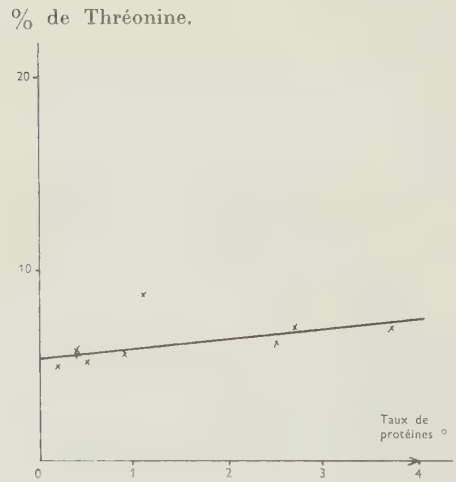


Fig. 54 — Variation de la **Thréonine** en fonction du taux de protéines des échantillons de DNA.

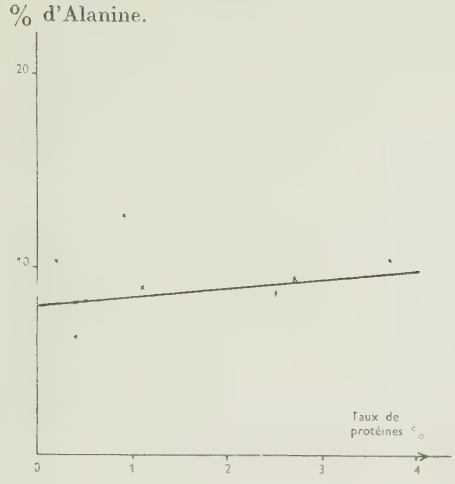


Fig. 55. — Variation de **l'Alanine** en fonction du taux de protéines des échantillons de DNA.

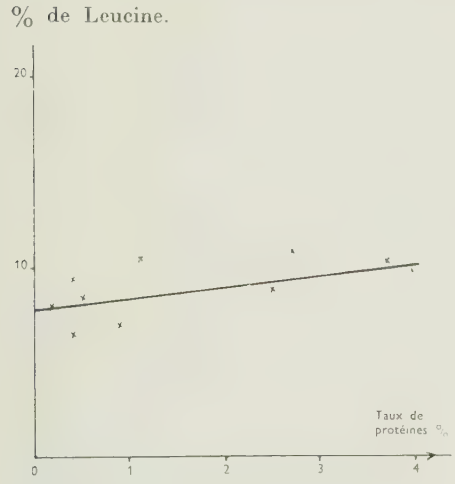


Fig. 56. — Variation de la **Leucine** en fonction du taux de protéines des échantillons de DNA.

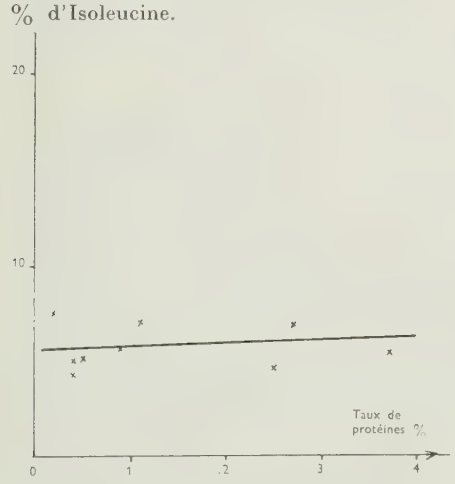


Fig. 57. — Variation de **l'Isoleucine** en fonction du taux de protéines des échantillons de DNA.

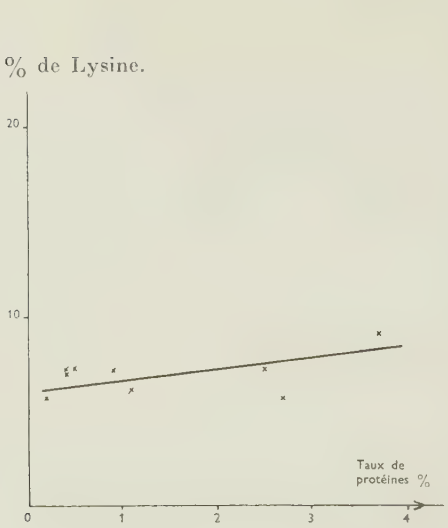


Fig. 58. — Variations de la **Lysine** en fonction du taux de protéines des échantillons de DNA.

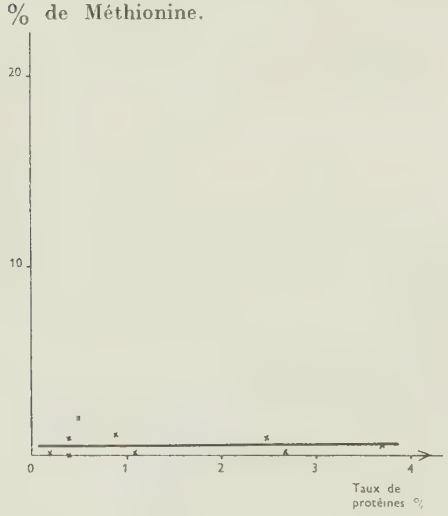


Fig. 59. — Variation de la **Méthionine** en fonction du taux de protéines des échantillons de DNA.

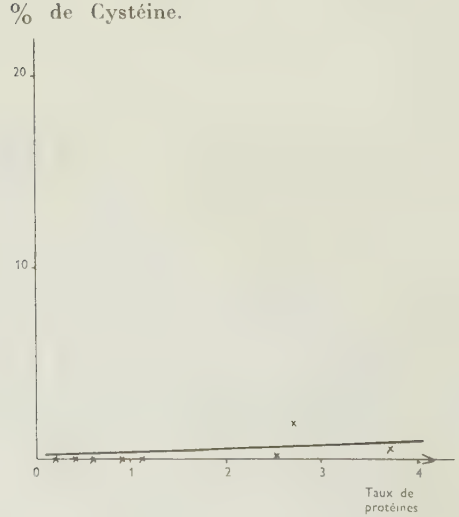


Fig. 60. — Variation de la **Cystéine** en fonction du taux de protéines des échantillons de DNA.

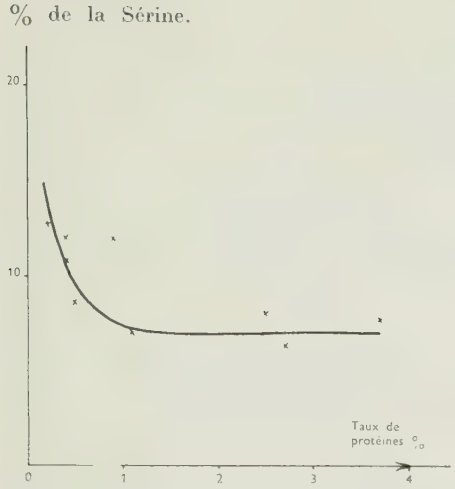


Fig. 61. — Variations de la **Sérine** en fonction du taux de protéines des échantillons de DNA.

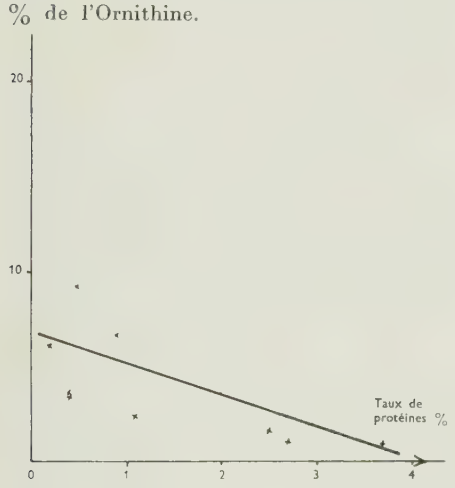


Fig. 62. — Variation de **l'Ornithine-Like** en fonction du taux de protéines des échantillons de DNA.

— les acides aminés aromatiques : tyrosine et phénylalanine (fig. 52 et 53);

— la thréonine (fig. 54) l'alanine (fig. 55), la leucine (fig. 56) et l'isoleucine (fig. 57).

— la lysine dont le taux ne varie qu'entre 5,7 et 9 % (fig. 58) peut être classée dans les amino-acides à taux constant. Nous remarquons toutefois que l'augmentation de cet amino-acide semble proportionnelle au taux des PR.DNA.

— Enfin nous pouvons remarquer le taux constant mais extrêmement faible des amino-acides soufrés, méthionine et cystéine (fig. 59 et 60).

ii : *Amino-acides à taux variable.*

— La sérine : il ressort en effet que le taux de sérine croît avec la diminution du taux des PR.DNA. Plus le taux est bas et plus le pourcentage de sérine est élevé, comme l'indique la figure 61.

— L'ornithine : son taux augmente avec le degré de purification du DNA (fig. 62).

Il est toutefois plus difficile de trouver une explication à ce phénomène car l'ornithine n'a jamais été signalée dans les travaux déjà publiés à ce sujet. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la présence de cet amino-acide :

1) L'ornithine fait bien partie des PR.DNA. En effet sa présence a déjà été signalé edans quelques peptides bactériens tels que la tyrocidine A (constituant de la tyrothricine) et les bacitracines.

2) Cet amino-acide se forme au cours des manipulations grâce à la présence d'arginase.

3) Ce que nous croyons être de l'ornithine sur les chromatogrammes n'en est pas et il s'agit d'un produit de dégradation formé au cours de l'hydrolyse à partir des nucléotides. Cette hypothèse est peu vraisemblable car, il n'y a pas de relation entre le taux de cet amino-acide et la concentration en DNA de la solution initiale.

4) Il ne s'agit ni d'ornithine, ni d'un produit de dégradation formé au cours de l'hydrolyse, mais d'un composé azoté réagissant avec la ninhydrine, présent initialement dans l'échantillon de DNA et migrant au niveau de l'ornithine. Cette hypothèse nous paraît la plus vraisemblable, c'est pourquoi nous employerons le terme « ornithine-like ».

— Le taux d'arginine d'autre part, semble varier avec le mode de préparation du DNA (fig. 63). En effet, ce sont les échantillons préparés par une méthode enzymatique à la papaïne qui sont les plus riches en arginine.

— L'histidine, comme l'ornithine-like et la sérine, semble diminuer en fonction du taux des PR.DNA (fig. 64), bien que cette variation soit moins nette que dans les 2 cas précédents.

— La proline, pour sa part, semble varier dans des proportions non négligeables sans aucun lien apparent, ni avec le taux des protéines, ni avec la méthode de préparation du DNA (fig. 65).

— Enfin nous pouvons constater des variations importantes d'un composé non identifié (X) en fonction du taux de protéine (fig. 66). Cette variation est parallèle à celles de la sérine et de l'ornithine-like. Ce composé est élué, sur nos chromatogrammes, au bout de 30 ml et à l'emplacement de l'acide cystéique.

Il nous paraît important, pour terminer cette discution, de souligner que parmi les amino-acides qui « collent » le plus au DNA, se trouvent deux composés qui n'ont pas été identifié avec certitude; ils réagissent avec la ninhydrine mais nous ne pouvons pas affirmer qu'il s'agit bien d'amino-acides. Il s'agit peut-être d'amines ou d'acides aminés particuliers dont la présence a déjà été signalée dans des préparations de DNA d'origine microbienne (voir introduction).

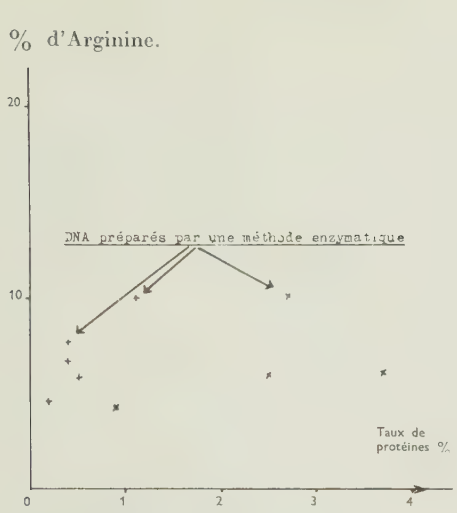


Fig. 63. — Variation de **l'Arginine** en fonction du taux de protéines des échantillons de DNA.

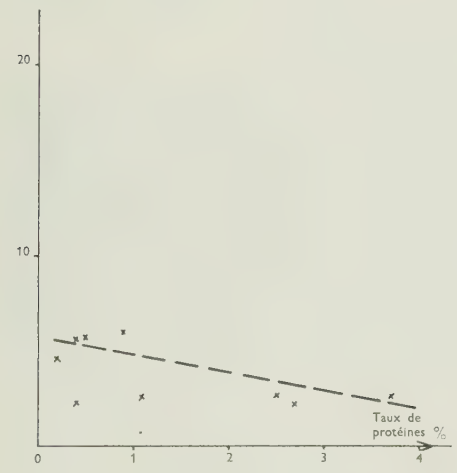


Fig. 64. — Variation de **l'Histidine** en fonction du taux de protéines des échantillons de DNA.

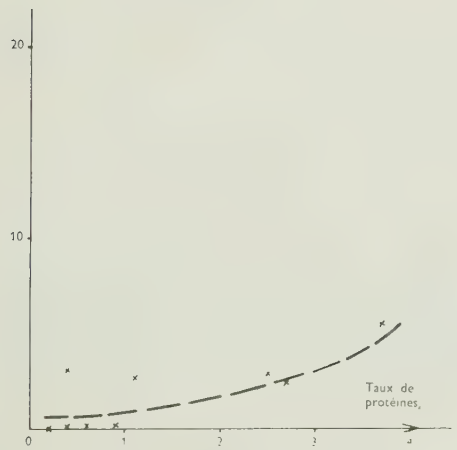


Fig. 65. — Variation de la **Proline** en fonction du taux de protéines des échantillons de DNA.

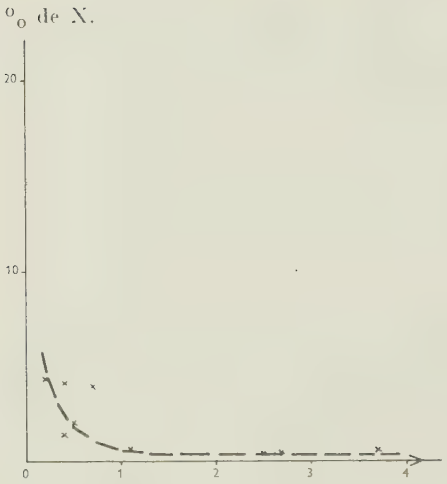


Fig. 66. — Variation de X en fonction du taux de protéines des échantillons de DNA.

b) Variation du rapport $\frac{\textit{Acides aminés basiques}}{\textit{Acides aminés acides}}$.

Ce rapport est dans tous les cas voisin de 1 (fig. 67). Il n'atteint jamais les valeurs caractéristiques des protéines basiques (1,5 à 5) ([152]). Il a même tendance à s'abaisser lorsque le taux des PR.DNA augmente, par suite de la diminution de deux des amino-acides basiques (l'histidine et l'ornithine-like). Nous pouvons donc affirmer que les PR.DNA ne sont pas constituées uniquement d'histones. Nous constatons d'autre part un assez grand parallélisme dans les résultats. C'est ainsi que les différences du taux des amino-acides entre les lots H et J sont minimes (fig. 9 et 10) bien que le taux des protéines varie de 1 à 9. La ressemblance d'un échantillon à un autre permet d'exclure d'autre part, la présence d'histones dans les PR.DNA.

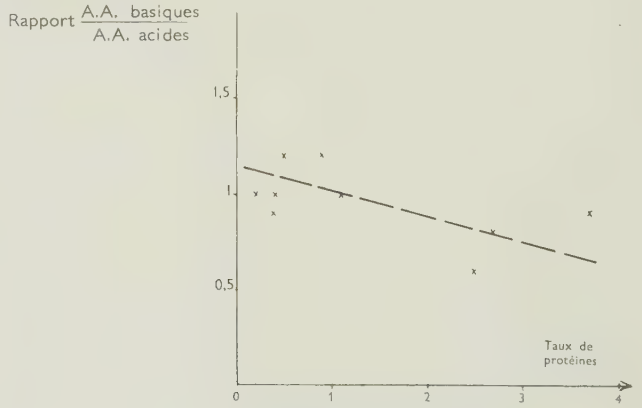


Fig. 67. — Variation du rapport $\frac{\text{A.A. basiques}}{\text{A A. acides}}$ en fonction du taux de protéines des échantillons de DNA.

c) Apparition de fractions inhabituelles.

Nous n'avons, jusqu'à présent, discuté que des variations des amino-acides entrant dans la composition des protéines. Cependant nous avons pu déceler, sur les différents chromatogrammes, l'apparition de fractions inhabituelles, ne migrant pas au niveau d'un amino-acide connu et que nous n'avons pas pu, jusqu'à maintenant, identifier.

— Dans 7 chromatogrammes sur 10, il est apparu une substance réagissant avec la ninhydrine avec un maximum d'absorption à 440 mμ. La position de cette fraction n'était pas fixe, et elle apparaissait entre 300 et 360 ml. Pour l'échantillon E, elle s'est superposée à la méthionine et pour l'échantillon F, elle s'est superposée à l'isoleucine, ce qui explique probablement le taux apparemment élevé de ces amino-acides dans les chromatographies correspondantes. En effet, bien qu'absorbant la lumière à 440 mμ, elle absorbait légèrement à 570 mμ d'où une erreur par excès que nous n'avons pas cherché à corriger.

— Dans 5 chromatographies sur 10, il est apparu au bout de 45 ml une fraction absorbant la lumière d'une façon identique aux deux longueurs d'onde (570 et 440 mμ).

— Enfin, nous avons observé dans une seule chromatographie, le dédoublement d'un pic ayant son maximum d'absorption à 570 mμ et élué au bout de 75 ml; cet emplacement correspond, sur une chromatographie réalisée avec un mélange standard, à la méthionine sulfoxide.

Il ne nous a pas été possible d'identifier ces substances inconnues étant donné le manque de régularité de leur présence sur les chromatogrammes et surtout leur faible concentration.

Des fractions inconnues et réagissant avec la ninhydrine ont déjà été signalées dans la littérature. Sueoka [190] en étudiant la composition en amino-acides, des protéines totales de diverses bactéries, a mis en évidence de tels composés mais en faible quantité (moins de 1 % de la surface totale des pics). Coval et coll. [45] en étudiant la composition en amino-acides de plusieurs bactériophages ont révélé la présence de substances inconnues présentes dans les hydrolysats de phage mais non dans les hydrolysats de DNA, extraits à partir de ces phages. Selon ces auteurs, il ne s'agit pas des polyamines communément associées au DNA de bactériophage (voir p. 6). Ces deux auteurs ont séparé leurs amino-acides par chromatographie sur colonne avec un appareillage voisin du nôtre mais la position des pics inconnus n'est pas signalée.

d) Comparaison avec les résultats déjà obtenus par divers auteurs.

Les résultats que nous obtenons concordent dans l'ensemble avec ceux déjà mentionnés dans la littérature :

— en effet il a toujours été signalé un taux élevé d'acides aminés dicarboxyliques [11, 16, 147, 27, 38] ;

— Champagne et coll. [41] ont montré que les amino-acides basiques et plus particulièrement la lysine diminuent préférentiellement au cours d'une déprotéinisation très poussée. Nous observons également ce phénomène, nettement moins accentué cependant.

— L'augmentation de la sérine en fonction de la déprotéinisation du DNA a déjà été signalée par Bendich [13]; cet auteur a d'ailleurs prétendu que la sérine serait incluse grâce à sa fonction alcool, au sein même de la chaîne sucre-phosphate du DNA.

— Les variations que nous obtenons pour l'histidine sont parallèles à celles obtenues par Champagne et coll. [41] (tableau 5).

Il nous faut cependant faire une restriction à propos de la phénylalanine. Les résultats chromatographiques que nous présentons dans le chapitre VI (après fractionnement des PR.DNA sur Dowex 50 × 2) montrent en effet la présence au niveau de cet amino-acide de nombreux composants azotés réagissant avec la ninhydrine. Nous n'avons pas recherché de tels composants au cours des chromatographies analysées dans ce chapitre et nous attribuons à la phénylalanine l'ensemble du pic correspondant à cet amino-acide.

C. Cas particulier d'un DNA préparé à partir de cellules d'ascite d'Ehrlich.

A la suite des travaux de Golder et coll. [76] concernant les variations du taux des protéines associées aux DNA isolés de cellules d'ascites traitées in vivo par des moutardes azotées, nous avons voulu vérifier, dans un premier temps, si les protéines associées à de tels DNA avaient une composition différente en amino-acides. Il s'agit de l'échantillon de DNA V.

1. *Caractéristiques de l'analyse chromatographique.*

taux de protéines	6,0 %
prise d'essai de la solution de DNA	50 ml
DNA initialement contenu dans la prise d'essai	36,5 mg
Protéines chromatographiées après hydrolyse (ClH — 6N)	2,2 mg

2. *Résultats obtenus.*

Ils sont mentionnés dans le tableau 28 et la figure 68.

Nous avons, comme dans les chromatographies précédentes, mis en évidence des fractions inhabituelles :

— une fraction éluée au bout de 45 ml;
une fraction éluée au bout de 315 ml.

Par contre, nous avons observé sur ce chromatogramme, l'apparition de deux nouvelles fractions absorbant la lumière à 570 mμ :

une fraction migrant au niveau de la phénylalanine (ce qui nous a empêché d'évaluer cet amino-acide);
une fraction migrant au niveau du tryptophane.

Ces deux fractions seront d'ailleurs retrouvées au cours de la détermination en amino-acides des fractions obtenues par chromatographie sur Dowex 50 × 2 des PR.DNA (chap. VI).

TABLEAU 28

Composition en amino-acides des PR.DNA obtenus a partir d'un DNA de cellules d'ascite d'ehrlich préparé par une méthode au phénol [104].

Taux de protéines de l'échantillon de DNA : 6,0 %

Les résultats sont exprimés en moles pour 100 moles analysées.

Amino-acides	DNA n° V
ASP	10,5
GLU	16,1
ALA	12,9
VAL	5,3
LEU	12,5
ILEU	5,6
PHE	non déterminé
TYR	0
SER	7,3
THR	5,0
PRO	4,2
MET	0
CYS	0
ARG	5,0
HIS	1,3
LYS	1,6
ORN	12,7
X	0
Acides aminés basiques / Acides aminés acides	0,8

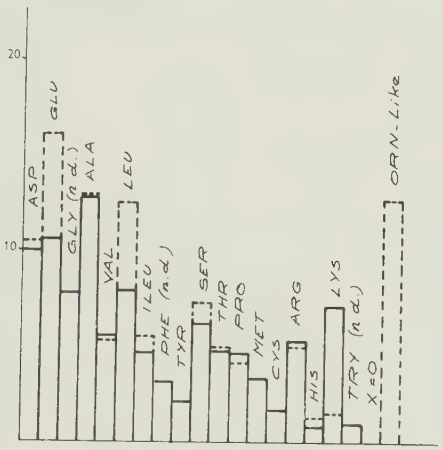


Fig. 68. — Composition en Amino-Acides (rapport $\frac{\text{A.A. basiques}}{\text{A.A. acides}} = 0{,}8$; riche Glu, Leu, Ala; pauvre en Lys.) des PR-DNA obtenues à partir de l'échantillon de DNA n° V (- - -) comparativement à une protéine normale d'E. Coli (——) (Morowitz 140).

n.d. Amino-Acide non déterminé.

Taux de protéines du lot V 6 % Met, 1/2 Cys, Tyr = 0.

3. *Discussion.*

Nous pouvons constater une assez grande similitude entre la composition en amino-acides de ces PR. DNA et celle des autres PR. DNA dont nous avons déjà discuté page 88. Compte tenu du taux élevé des protéines (6 %) il existe cependant 3 différences nettes :

— le taux extrêmement faible de lysine;

— la présence d'ornithine-like en grande quantité, alors que les autres résultats nous avaient montré une diminution de ce composé en fonction du taux de protéines;

— enfin la présence de deux fractions inconnues « ninhydrine-positives ».

Par contre, le taux des acides aminés dicarboxyliques est toujours très important. En effet, quelle que soit la méthode de préparation du DNA et quelle qu'en soit son origine, nous trouvons un taux élevé de ces deux amino-acides.

D. Conclusion de ces expériences.

Nous pouvons, en examinant ces résultats et en les comparant à ceux déjà publiés dans la littérature, dégager les principaux points suivants :

1) Un taux élevé et constant des deux acides aminés dicarboxyliques. Cette particularité a été signalée par de nombreux auteurs (voir p. 97) et a permis à Kirby ([104, 105]) de supposer l'existence de liaisons de coordination entre les groupements carboxyliques libres de la protéine et le DNA grâce à des ions métalliques. Ce mode de liaison, encore hypothétique, expliquerait en effet fort bien la prédominance et la constante de l'acide aspartique et de l'acide glutamique.

2) Une ressemblance avec les résultats de la littérature qui ne s'arrête pas aux amino-acides dicarboxyliques. Si nous comparons nos résultats avec ceux du tableau 5, nous constatons en effet une assez grande similitude.

3) Un parallélisme net entre les différents résultats quelle que soit l'importance du taux de protéines, pour la plupart des amino-acides. Ce parallélisme accompagné du fait que le rapport $\frac{\text{acides aminés basiques}}{\text{acides aminés acides}}$ est voisin ou inférieur à 1 est peu en faveur de la présence de protéines basiques du type histone.

4) Certains amino-acides semblent augmenter au fur et à mesure de la diminution du taux de protéines.

Ce sont :

- la sérine;
- l'ornithine-like;
- un composé non identifié appelé X et migrant au niveau de l'acide cystéique;

et à un degré moindre, l'histidine.

Deux de ces composés, s'ils réagissent avec la ninhydrine, ne sont peut-être pas des amino-acides.

5) Nous avons d'autre part, mis en évidence des fractions inconnues réagissant avec la ninhydrine. Il s'agit peut-être là d'amino-acides qui n'entrent pas classiquement dans le composition des protéines. Or, de tels amino-acides (comme l'acide αε-diaminopimélique) entrent dans la composition de membranes bactériennes.

Ces différentes conclusions peuvent être rassemblées dans le tableau 29.

TABLEAU 29

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES PR.DNA
PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES.

Amino-acides	Remarques
ASP et GLU	taux élevé et constant
SER	augmentation avec le degré de purification du DNA
HIS	— — —
ORN-like	— — —
X (cys. ac?)	— — —
autres amino-acides	grande ressemblance d'un échantillon à un autre
Rapport $\frac{\text{A.A. basiques}}{\text{A.A. acides}}$	voisin de 1

Présence de fractions non identifiées réagissant avec la ninhydrine.

CHAPITRE V

MIGRATION ÉLECTROPHORÉTIQUE DES PR.DNA

Les résultats précédents nous ont montré que, quelle que soit la méthode de préparation du DNA utilisée, les PR.DNA retrouvés après élimination des composés dialysables (nucléotides, et amino-acides libres) ont une composition relativement constante en amino-acides. Nous avons donc voulu vérifier si cette homogénéité analytique correspondait en réalité à une structure unique et si nous nous trouvions en présence d'un seul et même composé ou bien en présence d'un mélange de peptides et de protéines plus ou moins variable suivant la méthode utilisée pour préparer le DNA.

Dans ce but nous avons réalisé des électrophorèses des résidus protéiques dans les différents systèmes précédemment étudiés (pages 65, 66). Si, plusieurs auteurs ([21, 146, 145, 63, 98 b]) ont déjà étudié le comportement électrophorétique des histones obtenues à partir de nucléoprotéines de différents organes, à notre connaissance l'électrophorèse de ces PR.DNA intimement liés au DNA n'a pas encore été étudiée. Seule la présence de peptides dans des préparations de RNA a déjà été signalée ([84, 79]).

Les résultats que nous présentons dans ce chapitre ne sont toutefois que qualitatifs et préliminaires; ils peuvent cependant servir de base à une étude ultérieure plus approfondie sur la nature exacte des protéines associées au DNA.

Les séparations chromatographiques présentées dans le chapitre VI ne doivent être elles aussi, considérées que comme préliminaires.

A. Résultats.

1. Électrophorèses sur papier.

Nous avons utilisé 3 échantillons différents de DNA (tableau 30) et les migrations ont été réalisées suivant la technique décrite page 65.

TABLEAU 30

Électrophorèse sur papier.
Caractéristique des échantillons de DNA utilisés.

Échantillons analysés	Méthode de préparation	Quantité de protéines soumises à l'électrophorèse (Technique de Lowry)
DNA n° E	Signer et Schwander	10 µg
— F	Signer et Schwander	10 —
— G	Signre et Schwander	30 —

Dans les premières expériences l'électrophorèse a duré 18 heures. Dans ces conditions nous n'avons pu mettre aucune fraction en évidence. Nous avons alors repris cette expérience en ne faisant migrer nos résidus que pendant 3 heures.

Les figures 69, 70, 71, nous montrent les résultats obtenus : l'Amido-Schwartz ne révèle qu'une seule et large zone. Ces derniers résultats excluent donc la présence de protéines de poids moléculaire élevé (voisin de celui des albumines) puisque ces protéines migrent en 18 heures d'environ 9 centimètres dans les systèmes tampons utilisés.

ADN : E
50 µl : 10 µg
pH 8,6 : 3H

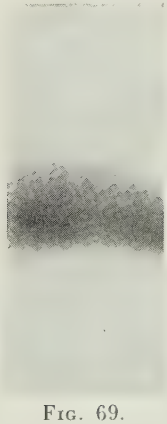


Fig. 69.

pH 8,6 : 3H
DNA : F
50 µl : 10 µg

Fig. 70.

pH 8,6 : 3H
DNA : G
50 µl : 30 µg

Fig. 71.

2. Électrophorèses en gel d'amidon.

La séparation des protéines par électrophorèse sur papier n'est pas très sélective, c'est pourquoi nous avons utilisé le gel d'amidon comme support, son pouvoir résolutif étant nettement supérieur.

Les électrophorèses ont été réalisées en utilisant 7 échantillons différents de DNA (tableau 31), suivant les techniques décrites page 66.

TABLEAU 31

Électrophorèses en gel d'amidon.
Caractéristiques des échantillons de DNA utilisés.

Échantillons analysés	Méthode de préparation	Quantités de protéines soumises à l'électrophorèse (Technique de Lowry)
DNA n° D	Aubin et Coll.	200 µg
— E	Signer et Schwander	20 —
— G	Signer et Schwander	65 —
— J	Kay et Coll.	65 —
— L	Signer et Schwander	20 —
— M	Signer et Schwander	70 —
— N	Kirby	140 —

Les résultats sont schématisés dans les figures 72, 73, 74 et 75.

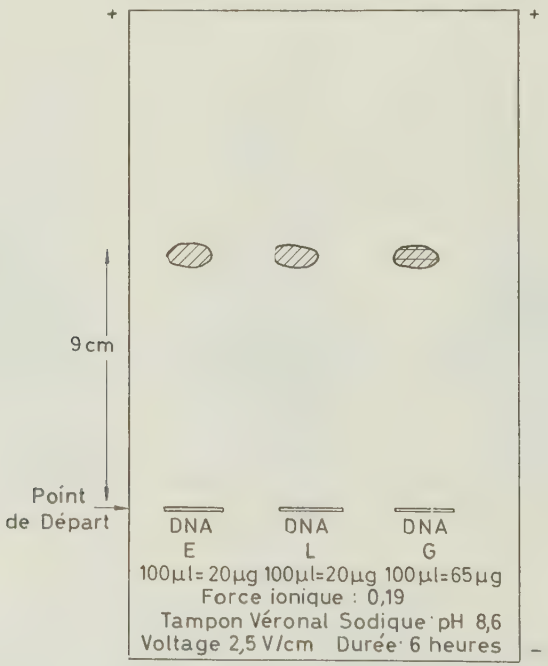


Fig. 72. — Électrophorèses en Gel d'Amidon des Contaminants Protéiques extraits de DNA.

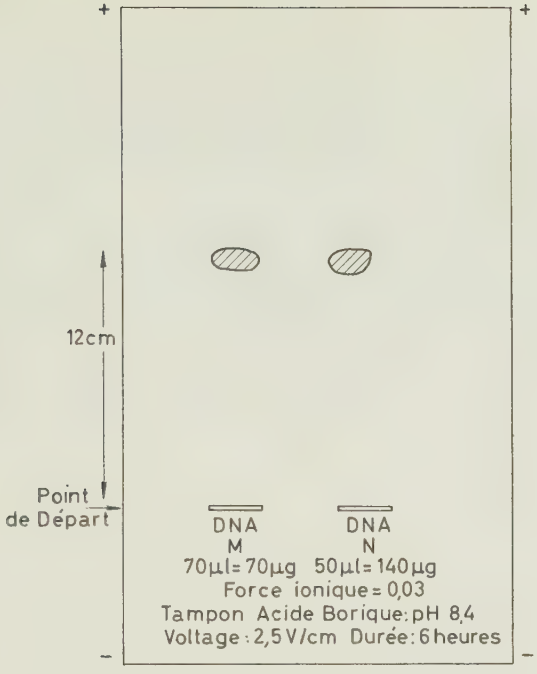


Fig. 73. — Électrophorèses en Gel d'Amidon des Contaminants Protéiques extraits de DNA.

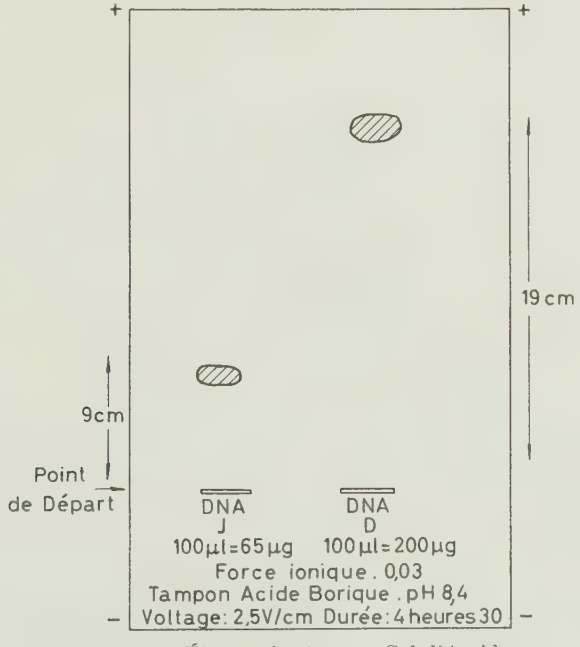


Fig. 74. — Électrophorèses en Gel d'Amidon des Contaminants Protéiques extraits de DNA.

Les premiers essais effectués sur les lots E, L et G nous ont montré la présence d'un composant protéinique migrant de 9 cm en 6 heures dans un tampon véronal sodique (fig. 72). La présence d'une tache unique nous a fait ensuite utiliser le tampon boriqué dont la résolution est supérieure tout au moins pour les protéines sériques. Là encore, nous avons mis en évidence pour les 3 lots M, N et J, un seul composant dont la migration s'effectue sur 12 cm en 6 heures (fig. 73 et 74).

Par contre, pour le lot D (préparé par une méthode enzymatique) nous avons mis en évidence un composant, qui placé dans les mêmes conditions migre beaucoup plus rapidement (19 cm en 4 heures 30) (fig. 74).

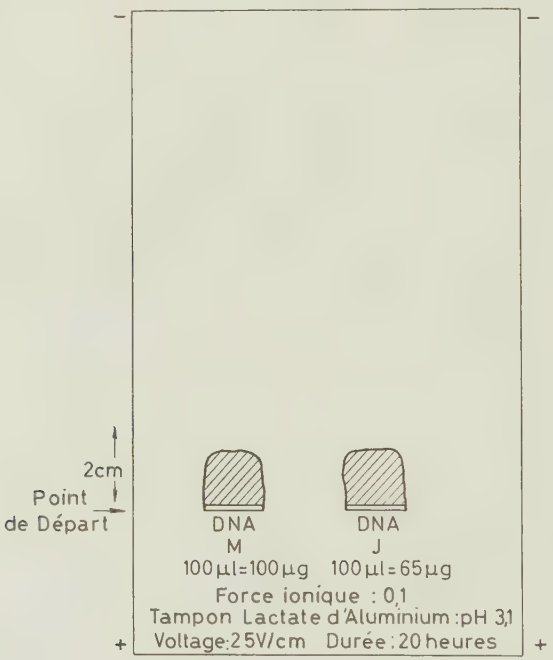


Fig. 75. — Électrophorèses en Gel d'Amidon des Contaminants Protéiques extraits de DNA.

En ce qui concerne les électrophorèses effectuées dans un tampon lactate d'aluminium, à pH 3,1 en 20 heures (caractérisation d'éventuelles protéines basiques), nous avons obtenu une traînée sur 2 cm (fig. 75).

B. Discussion.

Les résultats que nous avons obtenus par électrophorèse en gel d'amidon des PR. DNA permettent donc de penser que les amino-acides précédemment mis en évidence après hydrolyse de ces résidus, ou tout

au moins une partie d'entre eux, existent dans une association peptidique Ces molécules ont :

— une charge électrique voisine de la neutralité mais acide puisqu'elles se dirigent, comme les protéines sériques, vers le pôle positif en milieu alcalin;

— un faible poids moléculaire puisque leur vitesse de migration est rapide dans les systèmes utilisés. Pour essayer de préciser ce poids moléculaire, nous avons réalisé, dans les mêmes conditions, l'électrophorèse d'un peptide de poids moléculaire connu, l'insuline (PM $\#$ 6 000). La figure 76 nous montre une migration de 3 cm en 6 heures. Il est donc probable que le composé que nous identifions ait un poids moléculaire inférieur à 6 000, puisqu'il migre plus rapidement que l'insuline dans les mêmes conditions et que la charge électrique de l'insuline est également acide (PIE = 5,4).

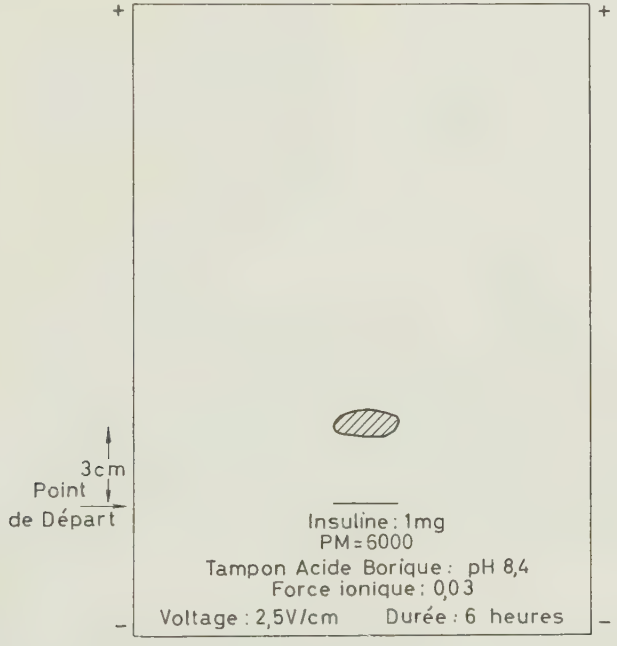


Fig. 76. — Électrophorèse en gel d'amidon d'un polypeptide de poids moléculaire connu.

Mais il est peu probable que, parmi les PR.DNA se trouvent des protéines de caractère basique semblables à des histones. En effet, les trainées obtenues à partir du point de départ, ne sont pas significatives car, dans les conditions ou nous nous sommes placés, des histones de références [histones totales obtenues à partir du thymus de veau (*)]

(*) Produits MANN.

se séparent en plusieurs bandes, la moins mobile se déplaçant d'environ 5 centimètres (fig. 77). Ces conclusions rejoignent celles fournies par l'analyse chromatographique, après hydrolyse chlorhydrique, des amino-acides constitutifs de ces résidus protéiques (voir chapitre précédent) : nous avions en effet un rapport $\frac{\text{A.A. basiques}}{\text{A.A. acides}}$ voisin de l'unité et une constance assez grande dans les résultats quelle que soit l'importance du taux des protéines.

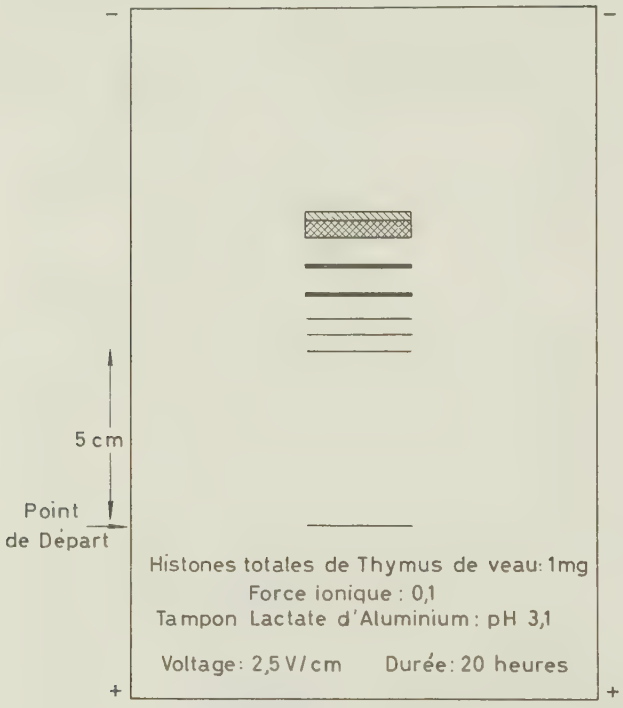


Fig. 77.

Nous avons également vérifié que les taches obtenues n'étaient pas dues aux enzymes ajoutés pour réaliser l'hydrolyse du DNA. Dans certaines électrophorèses, en effet (cas du lot D) la quantité d'enzymes ajoutés était décelable après révélation à l'amido-Schwartz. Des expériences réalisées avec le désoxyribonucléase I et la phosphodiestérase de venin de serpent ont montré que ces enzymes avaient une mobilité très différente (fig. 78).

Nous obtenons en effet après 18 heures de migration, une tache à 1,5 cm du point de départ pour la DNase I. Pour la phosphodiestérase de venin de serpent, nous retrouvons cette même tache et également deux autres taches respectivement à 0,5 et 1,5 cm de l'autre côté du point de départ (vers le pôle négatif).

— Un dernier point restait à préciser. En effet les nucléotides provenant de l'hydrolyse du DNA et non éliminés au cours de la dialyse ne peuvent-ils servir de support à un matériel protéique très hétérogène

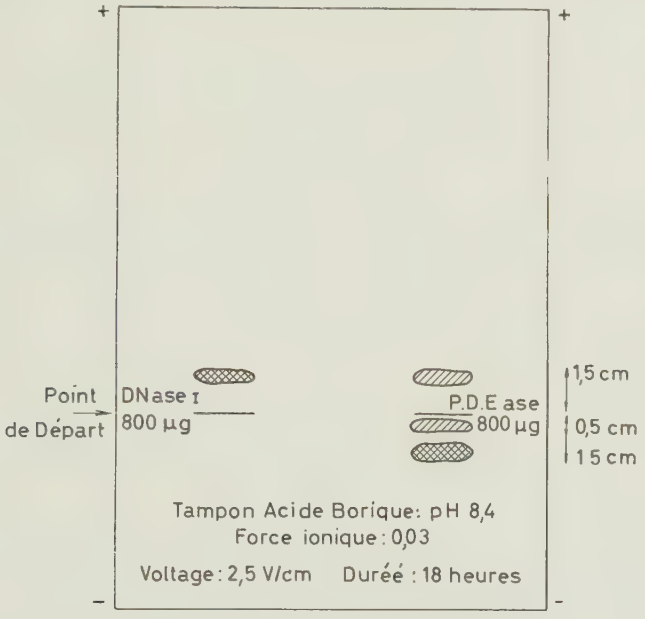


Fig. 78. — Électrophorèse en gel d'amidon de DNase I et de phosphodiestérase de venin de serpent.

entraîné avec eux par le courant électrique et révélé par l'Amido Schwartz? Cette éventualité est peu probable car des électrophorèses réalisées sur les nucléotides obtenus par hydrolyse du RNA [29, 56, 176] ont montré que ces composés se déplaçaient dans un tampon citrate de pH 3,5 sous 600 volts et pendant 8 heures, conditions très éloignées de nos systèmes électrophorétiques.

C. Conclusion.

Les extraits protéiques obtenus à partir de DNA préparés par les méthodes de Kirby, Signer et coll., Kay et coll., nous ont donné des résultats sensiblement identiques. C'est-à-dire que nous mettons en évidence un composant vraisemblablement de nature peptidique (poids moléculaire inférieur à 6 000) et de charge électrique voisine de la neutralité. Cette observation est en accord avec les résultats fournis par les expériences chromatographiques du chapitre précédent (rapport $\frac{\text{A.A. Basiques}}{\text{A.A. Acides}}$ et similitudes des différents résultats).

Deux hypothèses peuvent être alors envisagées :

1. Ce composé, apparemment homogène dans les systèmes électrophorétiques que nous utilisons puisque nous n'obtenons qu'une seule tache, n'englobe qu'une partie des amino-acides identifiés dans le chapitre précédent.

En effet, l'électrophorèse réalisée avec un peptide témoin de poids moléculaire connu montre que ce composé aurait un faible poids moléculaire inférieur à 6 000. Or si l'on regarde la composition en amino-acides de ces résidus, telle qu'elle résulte de l'analyse chromatographique, on constate que le poids moléculaire d'un composé théorique contenant tous ces amino-acides serait beaucoup plus élevé (approximativement compris entre 6 000 et 12 000). Ce composé de nature peptidique ne représenterait donc qu'une partie de l'ensemble des PR.DNA, partie révélable par l'amido-Schwartz. Rappelons à ce propos que l'Amido-Schwartz est un colorant anionique découvert en 1891 par Hoffmann et utilisé depuis 1951 pour colorer les diagrammes électrophorétiques ([82, 81]). La réaction est due à une précipitation des protéines par le colorant en milieu acide, précipitation qui est la conséquence, sans doute exclusive, d'une salification des groupes basiques des protéines par le colorant ([9]). Plum et coll. ([157]) ont montré que cette précipitation avait lieu également avec quelques amino-acides : la cystéine, l'arginine, la valine, le tryptophane et la di-iodotyrosine.

Mais l'électrophorèse est une technique qui ne permet pas de déterminer un poids moléculaire avec précision. C'est pourquoi l'argument que nous fournissons ne peut pas être considéré comme une preuve formelle d'autant que l'écart de poids moléculaire est faible.

2. Nous révèlons à l'Amido-Schwartz l'ensemble des PR.DNA :

soit sous la forme d'un composé peptidique homogène, hypothèse en accord avec la tache unique obtenue à l'électrophorèse ;

soit sous la forme des plusieurs petits peptides non séparés par l'électrophorèse, ces composés ayant des poids moléculaires très voisins ou une charge électrique identique.

D'autre part, les extraits protéiques obtenus à partir de DNA préparés par la méthode enzymatique de Aubin et coll. nous ont donné des résultats différents puisque le composé obtenu, vraisemblablement lui aussi de nature peptidique, a une vitesse de migration beaucoup plus rapide dans les systèmes utilisés. Il est possible que cette particularité provienne de l'utilisation même de la papaïne comme agent déprotéinisant, cet enzyme pouvant hydrolyser le contaminant protéique et laisser un résidu de plus faible poids moléculaire.

CHAPITRE VI

FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DES PR.DNA

Les résultats électrophorétiques du chapitre précédent nous ont montré la présence d'un composé de nature peptidique, de faible poids moléculaire. Nous avons voulu voir si la chromatographie permettrait un fractionnement plus important de ces composés.

Les expériences précédentes faites sur des DNA préparés par diverses méthodes ont montré un grand parallélisme aussi bien dans la composition en amino-acides que dans les migrations électrophorétiques. Aussi nous nous sommes bornés dans la suite de ce travail, à n'utiliser qu'une seule méthode de préparation du DNA, celle de Signer et Schwander. D'autre part, pour faciliter l'analyse nous sommes partis de quantités de DNA plus importantes (de 500 mg à 1 g) en échelonnant volontairement le taux des protéines par des purifications plus ou moins poussées. Mais l'isolement des PR.DNA reste identique à celui décrit page 74.

I. — CHROMATOGRAPHIE SUR DOWEX 50 × 2.

Comme nous l'avons dit précédemment (chapitre II, 4e paragraphe) les résines du type Dowex de grande porosité (50 × 4 ou 50 × 2) permettent le fractionnement de molécules de poids moléculaire élevé. Nous avons donc utilisé une résine Dowex 50 × 2 (200 à 400 mesh) pour essayer de fractionner nos résidus.

1. *Echantillons de DNA utilisés.*

Ces expériences ont été réalisées sur plusieurs échantillons de DNA préparés, à partir de thymus de veau, par la méthode de Signer et Schwander. Il s'agit des échantillons P, Q, R, S et W. Cet échantillon

W a été préparé à partir de noyaux préalablement isolés et purifiés par la méthode de Zalta ([215]) (voir page 67). Nous voulions vérifier de cette manière que les résultats obtenus n'étaient pas dus à une contamination cytoplasmique. En effet, les échantillons de DNA préparés directement à partir de thymus de veau peuvent contenir encore quelques impuretés d'origine cytoplasmique. Il a souvent été réalisé plusieurs chromatographies pour un même échantillon; chacune d'entre elles est désignée par un chiffre qui suit la lettre indiquant la référence du lot de DNA utilisé (tableau 19).

2. *Caractéristiques de la chromatographie.*

Elle a été réalisée sur une colonne identique à celle utilisée pour la séparation des amino-acides, mais remplie avec une résine Dowex 50 × 2.

Débit de l'éluant : 30 ml/heure.

Température : 30 °C.

L'élution est réalisée automatiquement grâce à l' « Autograd » avec le gradient suivant (tableau 38) (cf. paragraphe traitant la chromatographie sur colonne des amino-acides).

TABLEAU 32

Fractionnement sur Dowex 50 × 2 de PR.DNA
établissement du gradient d'élution.

Chambres	Tampon n° 1 pH 2,87	Tampon n° 2 pH 3,80	Tampon n° 3 pH 5,00
1	75 ml	0 ml	0 ml
2	0	70	5
3	6	9	60
4	0	0	75
5	0	0	75
6	0	0	75
7	0	0	75
8	0	0	75
9	0	0	75

Ce gradient, comparé à celui utilisé pour la séparation des amino-acides, est légèrement moins acide. Nous espérons ainsi, obtenir une meilleure séparation entre les nucléotides, molécules acides, non retenues par la résine et les PR.DNA, sensiblement neutres donc d'autant plus retenues que le pH de l'éluant est moins acide.

La colonne a été chargée avec des quantités variables de résidus protéiques comme l'indique le tableau 33.

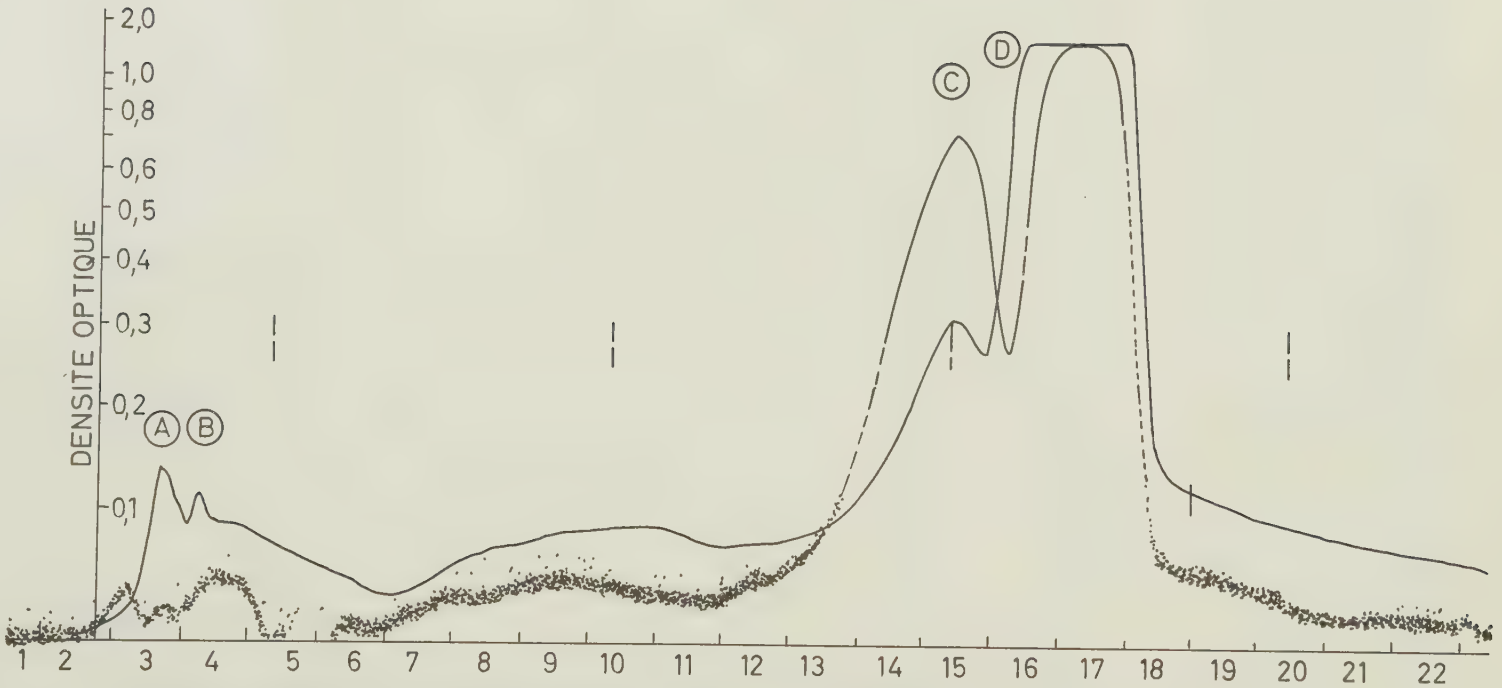


Fig. 79. — Exemple d'une chromatographie sur Dowex 50 × 2 des PR. DNA isolés à partir de l'échantillon de DNA P.

TABLEAU 33

Fractionnement sur Dowex 50 × 2 des PR.DNA.
Caractéristiques des mélanges introduits sur la colonne.

Échantillons Chromatographiques	P.ADN introduit sur la colonne (Burton)	PR.DNA introduit sur la colonne (Lowry)
P_1 (*)	8,18 mg	3,30 mg
P_3 (*)	12,20	4,95
Q	1,10	0,50
R_2	1,56	5,70
S_2	6,00	2,70
W_2	13,20	1,00

(*) Nous avons effectué deux chromatographies (nº 1 et 3) avec l'échantillon P.

A la sortie de la colonne, une faible partie de l'éluat (0,16 ml/mn, soit 9,6 ml/heure) est introduite dans le circuit analytique afin d'y déceler la présence éventuelle d'un composé réagissant avec la ninhydrine. En effet, les peptides et même les protéines réagissent, quoique plus faiblement avec la ninhydrine. Les 2/3 de l'éluat sont recueillis sur un collecteur de fractions (changement de tube toutes les 10 minutes). Les différents tubes correspondant aux fractions enregistrées sont alors réunis et leur contenu analysé.

3. *Résultats obtenus.*

a) *Enregistrement chromatographique.*

Ils ont toujours été identiques, quel que soit l'échantillon de DNA utilisé et nous avons observé l'apparition de 4 fractions (fig. 79).

Pic A : élué après 30 ml soit 1 heure,
maximum d'absorption situé à 570 mμ.
Pic B : élué après 35 ml soit 1 heure 10 mn,
maximum d'absorption situé à 570 mμ.
Pic C : élué après 140 ml soit 4 heures 40 mn,
maximum d'absorption situé à 440 mμ.
Pic D : élué après 160 ml soit 5 heures 20 mn,
maximum d'absorption situé à 570 mμ.

Ces deux dernières fractions, les plus importantes sur le chromatogramme, ne sont pas toujours très bien séparées et il est nécessaire dans ce cas, pour éviter une contamination d'abandonner les tubes intermédiaires.

b) *Analyse rapide des fractions recueillies.*

Sur ces 4 fractions, nous avons effectué un dosage de désoxyribose (technique de Burton) et un dosage d'amino-acides totaux (technique de Yemm et Cocking) après hydrolyse alcaline.

Les résultats figurent dans le tableau 34.

TABLEAU 34

Fractionnement sur Dowex 50 × 2 des PR.DNA.
Analyses des différentes fractions
obtenues a partir de plusieurs échantillons.

Échantillons analysés	Fractions recueillies	Volume de la fraction	P.ADN total (Burton)	Amino-acides totaux (Yemm-Cocking)
P1	A	6,8 ml	1 730 µg	560 µg
	B	6,9	475	180
	C	21,5	30	0
	D	14,6	10	2 250
P3	A	5,5	1 250	880
	B	1	51	43
	C	24	0	283
	D	18	10	3 240
Q	A	2	42	10
	B	3,5	452	0
	C	22	0	0
	D	25	0	760
R2	A	2	27	16
	B	6,5	346	91
	C	22	0	77
	D	40	0	4 080
S2	A	5	182	118
	B	5	364	362
	C	17	0	206
	D	43,5	0	2 175
W2	A	5	2 590	141
	B	2	111	52
	C	18	0	0
	D	19	22	846

Tout d'abord nous constatons que les résultats obtenus avec l'échantillon W sont identiques à ceux obtenus avec les autres échantillons. L'hypothèse d'une contamination cytoplasmique paraît donc assez improbable.

D'autre part, nous constatons que les deux premières fractions (A et B) contiennent beaucoup de P.ADN et peu d'amino-acides.

La fraction D par contre, correspond à l'isolement d'un composé riche en amino-acides (ou tout au moins en substances réagissant avec la ninhydrine) et pratiquement exempt de P.ADN. En première approximation nous pouvons donc dire que nous avons séparé un bloc « ninhydrine positif ». Toutefois ce bloc, s'il représente la majorité des amino-acides introduits n'en représente pas la totalité (tableau 34). Certains amino-acides semblent donc fixés très étroitement aux nucléotides et n'en sont pas séparés par chromatographie sur Dowex 50 × 2.

Quant à la fraction C, elle est peu riche en P.ADN et en amino-acides. Il est probable d'ailleurs qu'elle ne réagit pas avec la ninhydrine et que son absorption à 440 mμ est due à sa coloration jaune. Cette coloration nous fait penser qu'il s'agit peut-être d'un dérivé flavinique. De semblables dérivés ont d'ailleurs été trouvés par chromatographie sur Dowex 1 de nucléotides-peptides isolés de foie de bœuf ([207]).

4. *Conclusion.*

Le fractionnement des PR.DNA par chromatographie sur Dowex 50 × 2 nous a permis l'isolement de deux fractions principales :

— une fraction initiale contenant beaucoup de P.ADN et peu d'amino-acides ;

— une fraction terminale riche en amino-acides et exempte de P.ADN.

L'ensemble du matériel récupéré (P.ADN et amino-acides) ne représente qu'une partie du matériel introduit sur la colonne.

Nous allons maintenant essayer d'analyser dans le détail ces fractions, de déterminer quels sont les amino-acides récupérés et de rapprocher les résultats obtenus par la chromatographie de ceux obtenus par l'électrophorèse.

II. — ANALYSE DÉTAILLÉE DES FRACTIONS ISOLÉES PAR CHROMATOGRAPHIE DES PR.DNA SUR DOWEX 50 × 2.

Les différentes manipulations que nous avons effectuées sur ces fractions sont résumées sur le tableau 35.

TABLEAU 35

CHROMATOGRAPHIE SUR DOWEX 50 × 2 DES PR.DNA. ANALYSE DES FRACTIONS OBTENUES.

PR.DNA — Chromatographie sur Dowex 50 × 2 →

- Fraction A →
  - Dosage du P.ADN : p. 126
  - Dosage des Amino-acides totaux : p. 126
  - + ClH 6N → hydrolyse 118° 18 h. → Détermination des Amino-acides par chromatographie sur Dowex 50 × 8 : p. 126
  - Chromatographie sur papier : p. 129
  - Électrophorèses en gel d'amidon : p. 130
- Fraction B
- Fraction C
  - Dosage du P.ADN : p. 117
  - Dosage des amino-acides totaux : p. 117
  - Dosage du ribose : p. 118
  - Dosage de l'azote et du phosphore totaux : p. 118
- Fraction D
  - + ClH 6N → hydrolyse 118° 18 h. → Détermination des Amino-acides par chromatographie sur Dowex 50 × 8 : p. 119
  - Recherche du TRY
  - Chromatographie sur papier : p. 122
  - Électrophorèses en gel d'amidon : p. 125.

A. Analyse de la fraction terminale (Fraction D).

1. P.ADN *et amino-acides totaux.*

Les résultats sont schématisés sur le tableau 36. Le dosage des amino-acides totaux a été effectué par la méthode de Yemm et Cocking utilisant la ninhydrine. Il a été effectué après hydrolyse alcaline (p. 64) et également avant que ne soit faite cette hydrolyse. Wilken et Hansen [207] ont en effet utilisé cet artifice pour caractériser un peptide. Si la réaction colorée est plus forte après hydrolyse alcaline, il est très probable que l'on se trouve en présence d'un peptide; si les réactions colorées sont identiques avant et après hydrolyse, il s'agit au contraire d'un amino-acide ou d'un mélange d'amino-acides.

TABLEAU 36

Dosage du P.ADN et des amino-acides totaux sur les différentes fractions recueillies.

Lot de DNA utilisé	Composé peptidique avant hydrolyse alcaline (**) exprimé en µg/ml d'A.A. totaux (Technique de Yemm et Cocking)	Amino-acide totaux (µg/ml) après hydrolyse alcaline (**) (Technique de Yemm et Cocking)	Rapport $\frac{\text{DO après hydrolyse}}{\text{DO avant hydrolyse}}$	P.ADN (µg/ml) (Technique de Dische-Burton)
P1 (*)	56	154	2,75	0,60
P2	49	104	2,12	2,20
P3	—	180	—	0,54
W1	—	30	—	0,85
W2	46	45	0,99	1,18
Q	17	31	1,82	0
R1	21	21	1,00	0
R2	35	102	2,91	0
R3	42	126	3,00	0
S1	23	93	4,04	0
S2	28	50	1,79	0
S3	30	160	5,33	0

(*) Ce chiffre indique qu'il a été réalisé plusieurs chromatographies pour un même échantillon de DNA.
(**) Pour des explications complémentaires voir le texte.

Les résultats sont assez constants en ce qui concerne le dosage du P.ADN et traduisent dans l'ensemble une absence de désoxyribonucléotides puriques dans cette fraction.

Les résultats fournis par le dosage des amino-acides totaux indiquent des variations d'un échantillon à un autre, qui peuvent

s'expliquer par la variabilité des quantités de protéines introduites sur la colonne (voir tableau 33). Le rapport $\frac{\text{D.O après hydrolyse}}{\text{D.O. avant hydrolyse}}$ est très nettement supérieur à 1, ce qui indiquerait la présence d'un peptide dans cette fraction D. Deux échantillons font exception et ont un rapport égal à 1.

2. *Le Ribose.*

Cette détermination est nécessaire pour déceler la présence éventuelle de ribonucléotides (liés ou non à des peptides) ceci malgré l'improbabilité d'une contamination cytoplasmique (p. 115).

Les différentes fractions ne contenant pratiquement pas de désoxyribose, il nous a été possible de réaliser ce dosage directement, sans élimination préalable de ce sucre. Effectué sur les fractions de chromatographie des échantillons P_1 et P_2, il nous a donné des résultats négatifs, ce qui permet de conclure à l'absence de ribonucléotides puriques.

3. *Dosage de l'azote et du phosphore totaux.*

Leur détermination a été effectuée par la méthode que nous avons décrite page 39. Nous voulions vérifier, par le dosage du phosphore l'absence de tout composés nucléotidique (purique ou pyrimidique) et par le dosage de l'azote total, lié à celui des amino-acides totaux décrit plus haut, la présence de composés autres que des amino-acides.

Les résultats sont mentionnés sur le tableau 37.

TABLEAU 37

Dosage de l'azote et du phosphore totaux sur différentes fractions D recueillies.

Lot de DNA utilisé et n° de la chromatographie	Azote total (µg/ml)	Phosphore total (µg/ml)
P2	43	traces
W2	55	traces
R2	230	0
R3	130	0
S1	106	0
S3	81	0

Afin de vérifier si tout l'azote de cette fraction D était inclus uniquement dans les molécules d'acides aminés, nous avons calculé, d'après les valeurs portées sur le tableau 36, la quantité d'azote représenté par ceux-ci, en admettant qu'eux seuls réagissent avec la ninhydrine

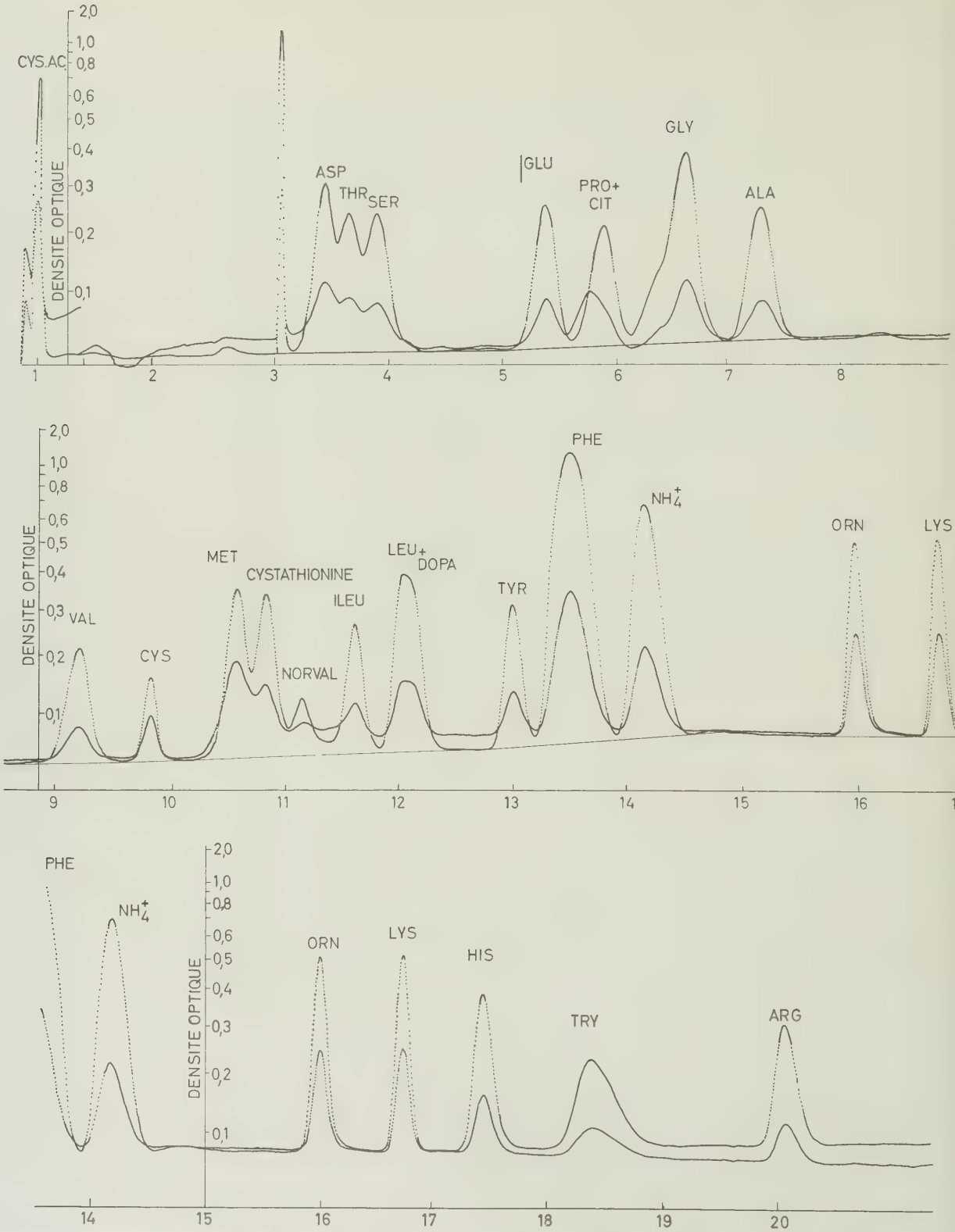


FIG. 80. — Chromatographie sur Dowex 50 × 8 de la fraction terminale (fraction D) obtenue par chromatographi sur Dowex 50 × 2 des PR.DNA isolés de l'échantillon de DNA S; hydrolysée par ClH 6N, elle est chromatographié sur Dowex 50 × 8 avec 100 µl d'un mélange standard d'amino-acides, jouant le rôle d'entraîneur.

et en nous basant sur un chiffre moyen de 16 % d'azote. Les résultats sont mentionnés dans le tableau 38.

TABLEAU 38

Répartition approximative de l'azote de certaines fractions D.

Lot de DNA utilisé et n° de la chromatographie	Amino-acides totaux (µg/ml) (tableau 36)	Azote total représenté par ces amino-acides (µg/ml)	Azote total expérimentalement trouvé (µg/ml) (tableau 37)	Pourcentage d'azote rattachable aux amino-acides
P2	104	16,6	43	38,6
W2	45	7,2	55	13,1
R2	102	16,3	230	7,1
R3	126	20,2	130	15,5
S1	93	14,9	106	14,1
S3	160	25,6	81	31,6

Ces résultats montrent que les différentes fractions D renferment d'autres composés azotés que des amino-acides. Ces substances azotées sont quantitativement très importantes puisqu'elles représentent de 61,4 à 92,9 % de l'azote total.

Par contre, il est certain que cette fraction D ne contient aucun nucléotide, qu'il soit à ribose ou a désoxyribose, purique ou pyrimidique. En effet, les dosages de ces deux pentoses ainsi que du phosphore total nous ont toujours donné des résultats négatifs.

4. *Détermination des constituants « ninhydrine-positifs » (amino-acides et autres composés azotés) par chromatographie sur colonne.*

Une partie aliquote de la fraction D, hydrolysée par ClH 6 N, est introduite sur la colonne de Dowex 50 × 8, mélangée à 100 microlitres d'une solution standard d'amino-acides (correspondant à 0,1 micromole de chaque amino-acide). L'addition de cette solution qui jouait un rôle d'entraîneur est nécessaire pour permettre une identification correcte des amino-acides. Leur détermination quantitative a été effectuée en retranchant des résultats ceux obtenus en chromatographiant un échantillon de 100 microlitres de la solution standard seule.

La figure 80 montre un exemple de chromatographie obtenue dans ces conditions. Nous pouvons constater que la séparation est moins bonne et que les pics sont plus étalés.

a) *Résultats obtenus.*

La détermination a été effectuée sur 6 échantillons différents. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 39. Ils sont exprimés en micromoles d'amino-acides, déduction faite du mélange standard ajouté comme entraîneur.

TABLEAU 39

Composition en amino acides de la fraction terminale D de quelques échantillons de PR.DNA.

Amino-acides	W1	Q	R1	R2	S1	S2
CYS AC ...	0,16	0,05		0,10	0,01	0,18
ASP.....	non déterminé	0,07	+	0,17	0,16	0,15
THR	non déterminé	0,17	+	0,09	0,17	0,19
SER	—	0,09			0,04	—
GLU	0,03	0,03	+	0,06	0,21	0,06
PRO	0,01	0,04		—	—	0,01
GLY	0,66	0,39	+	0,36	0,13	0,16
ALA	0,05	0,03		0,07	0,09	0,05
VAL	0,03	0,06		0,07	0,05	0,04
1/2CYS.....	—	—		—	—	—
MET	—	0,06		0,03	—	0,03
ILEU	0,03	0,03		0,05	0,03	0,03
LEU	—	0,04		0,05	0,05	—
TYR	—	0,02		0,02	++++	—
PHE	++++	++++	+	++++	0,05	++++
ORN	—	0,07		0,08	0,01	—
LYS	—	0,04		0,07	0,06	0,01
HIS	—	0,04		0,04	0,02	0,01
TRY-like ..	0,29	0,54	+	0,56	0,18	0,11
ARG	—	0,04		0,05	0,02	—

N.B. L'augmentation de la phénylalanine était trop importante pour faire l'objet d'une détermination quantitative.
Les résultats sont exprimés en micromoles d'amino-acides.

b) *Discussion des résultats.*

Bien que la sensibilité de cette technique soit grande, il est prudent de ne considérer comme significative que les augmentations de l'ordre du dixième de micromole. Dans ces conditions, nous pouvons admettre dans la fraction D la présence des amino-acides suivants (tableau 40).

Dans ce tableau, on peut remarquer :

— la présence constante de phénylalanine et d'un composé migrant au niveau tryptophane;

— la présence de tyrosine dans l'échantillon S 1.

Ces constatations méritent d'être discutées. En effet, le tryptophane dans les conditions d'hydrolyse où l'on opère est détruit et la détermination du spectre de cette fraction D ne nous a pas montré d'absorption à 280 mμ, caractéristique des acides aminés aromatiques.

Afin de vérifier si les pics enregistrés correspondaient à ces amino-acides, nous avons collecté les fractions de la chromatographie réalisée avec l'échantillon R 1, et correspondant en théorie à la phénylalanine (A) et au tryptophane (B), pour les identifier par chromatographie sur papier.

TABLEAU 40

Amino-acides présents dans la fraction D de quelques échantillons de PR.DNA.

Amino-acides	Échantillons					
	W1	Q	R1	R2	S1	S2
Acide cystéique	+	0	0	+	0	+
Acide aspartique	n.d.	0	+	+	+	+
Thréonine	n.d.	+	+	+	+	+
Acide glutamique	0	0	+	0	+	0
Glycine	+	+	+	+	+	+
Tyrosine	0	0	0	0	+	0
Phénylalanine	+	+	+	+	0	+
Tryptophane-like	+	+	+	+	+	+
Alanine	0	0	0	0	+	0
Sérine	0	+	0	0	0	0

N.B. Pour l'échantillon R2 nous avons attribué l'augmentation à la thréonine plutôt qu'à la sérine en nous basant sur les résultats des autres échantillons.

Après déminéralisation de ces fractions (voir p. 64) nous avons effectué une chromatographie sur papier avec le butanol acétique comme solvant (voir p. 65) comparativement aux deux amino-acides témoins.

Les résultats obtenus sont schématisés sur la figure 81. Nous pouvons constater qu'aucune des fractions n'est pure et que nous ne retrouvons pas de taches au même endroit que les spots témoins.

Il est donc certain que la fraction D ne comprend ni phénylalanine, ni tryptophane. Les fractions éluées à l'emplacement de ces deux amino-acides sont ne probablement que des composés azotés (peut-être des amines) que l'on peut probablement rapprocher de ceux mis en évidence par le dosage de l'azote total (p. 118).

Si l'on reprend alors l'analyse du tableau 40, nous pouvons conclure à la présence générale ou presque de glycocolle, d'acide aspartique et de thréonine et à la présence plus irrégulière d'acide cystéique, d'acide glutamique, d'alanine et de sérine.

On constate donc une assez grande hétérogénéité peu en faveur d'une identité entre la fraction D isolée par chromatographie sur Dowex 50 × 2 et la fraction peptidique mise en évidence par électrophorèses sur divers supports.

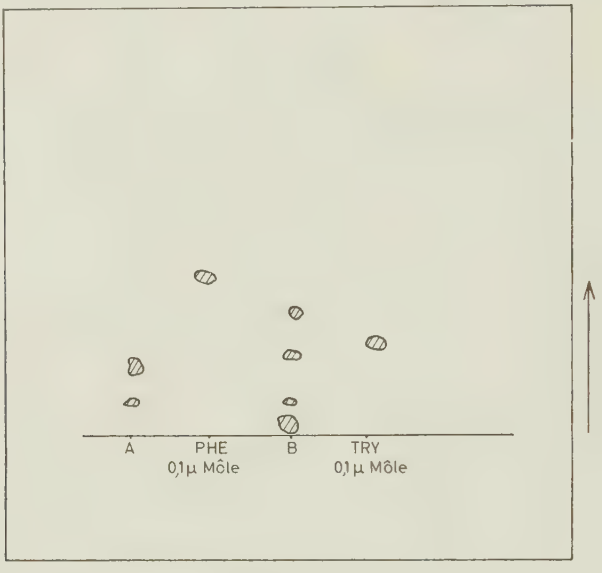


Fig. 81. — Chromatographie ascendante
— des fractions A et B obtenues à partir de l'échantillon R_1
— de solutions pures de phénylalanine et de tryptophane
Durée : 24 heures

Solvant : *n* butanol 80 ml
Acide acétique 20 ml
Eau distillée 100 ml
Papier Whatmann n° 3 MM.
Coloration à la ninhydrine

c) *Recherche du tryptophane.*

Le tryptophane étant complètement détruit au cours de l'hydrolyse acide, nous avons voulu contrôler la présence ou l'absence de cet aminoacide dans la fraction D. Nous avons appliqué la technique de Goodwin et Morton (page 67) aux trois échantillons W 2, R 3 et S 3. Les trois résultats ont été négatifs. Le tryptophane ne fait donc pas partie de cette fraction D.

5. *Chromatographie sur papier de la fraction* D.

Les résultats précédents nous ont montré que la fraction D contenait de nombreux composés azotés. Comme tous ces composés sont élués en même temps et ne donnent qu'une seule fraction par chromatographie sur Dowex 50 × 2, nous avons voulu vérifier en réalisant une chromatographie sur papier de cette fraction non hydrolysée par ClH 6 N si

nous étions en présence d'un composé homogène et si les diverses impuretés azotées n'étaient libérées qu'au cours de l'hydrolyse acide.

Les chromatographies ont été réalisées dans les systèmes solvants décrits page 65. Les chromatogrammes ont été révélés de deux manières différentes :

— par l'emploi de ninhydrine (page 65).
— par formation de DNP-peptide (p. 65).

Ces deux modes de révélation nous ont d'ailleurs donné des résultats différents.

a) *Révélation par la ninhydrine.*

L'expérience a été réalisée sur les échantillons

P1 : 28 µg de composé peptidique avant hydrolyse alcaline
P2 : 49 — — —
W2 : 46 — — —
R3 : 42 — — —
S3 : 30 — — —

Nous avons obtenu, dans les trois systèmes une seule tache pour les deux échantillons P 1 et P 2 et plusieurs taches pour les échantillons W, R et S. Parmi ces taches, une se trouve située à l'endroit occupé par la tache unique obtenue pour l'échantillon P. La figure 82 montre un exemple obtenu avec le système solvant butanol acétique.

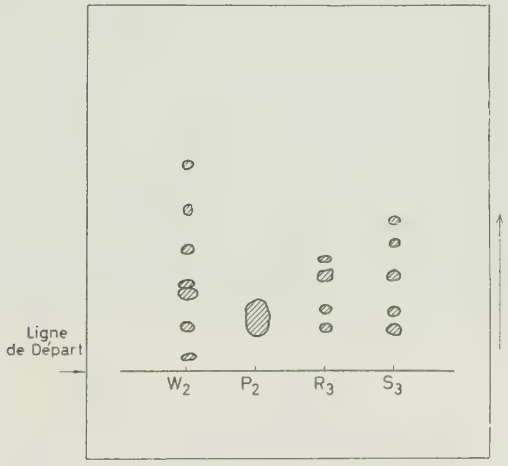


Fig. 82. — Chromatographie ascendante de diverses fractions D.
Durée : 24 heures

solvant : *n* Butanol 80 ml
Acide acétique 20 ml
Eau distillée 100 ml

Papier Whatmann nº 3 MM.

Cette tache unique est située dans tous les cas au même endroit. Il semblerait donc que l'échantillon P sur lequel ont été réalisées deux

chromatographies permette l'isolement d'une fraction terminale D relativement homogène. Quant aux autres fractions, elles sont hétérogènes et les composés azotés qu'elles renferment ne sont probablement pas libérés au cours de l'hydrolyse acide mais présents avant cette opération. Nous n'avons malheureusement pas pu déterminer la composition en amino-acides de la fraction terminale correspondant à l'échantillon P.

b) *Révélation par formation de* DNP *peptides.*

Cette expérience réalisée avec les échantillons P 2, W 1 Q et R 1, nous a toujours donné les mêmes résultats : mise en évidence d'une seule tache située à 5 centimètres de la ligne de départ (fig. 83), c'est-à-dire au même endroit que la tache unique révélée par la ninhydrine

Fig. 83. — Chromatographie ascendante de diverses fractions D
Durée : 24 heures.

Solvant : Acide isobutyrique : 66 ml
Eau : 33 —
NH_4OH : 1 —
Révélation : DNP-peptides

Papier Whatmann n° 3 MM.

Si les fractions terminales isolées par chromatographie sur Dowex 50 × 2 sont hétérogènes, ce que semblent indiquer les résultats présentés dans ce chapitre, il n'en reste pas moins vrai, qu'elles contiennent une fraction peptidique homogène. Il ne nous est pas possible, d'après les résultats que nous avons obtenus de déterminer la constitution de ce peptide. Nous pouvons seulement dire d'après les résultats présentés

dans le tableau 40 que les seuls amino-acides communs à tous les lots sont : acide aspartique, thréonine et glycine.

Quant aux autres fractions révélées par la ninhydrine et ne formant pas de DNP-peptides, elles peuvent être constituées par un peptide ne possèdant pas de groupement NH_2 terminal ou bien correspondre à des amino-acides non engagés dans une liaison peptidique.

6. *Electrophorèses de la fraction* D.

Dans une dernière étape, nous avons voulu vérifier si cette fraction terminale D correspondait au peptide que nous avions mis en évidence à partir des PR.DNA totaux (chapitre v). Nous avons donc réalisé, à partir de cette fraction des électrophorèses sur gel d'amidon :

— avec un tampon à l'acide borique de pH 8,4;
— avec un tampon au lactate d'aluminium de pH 3,1 en utilisant les techniques décrites page 65.

Les principales caractéristiques des électrophorèses entreprises sont résumés sur le tableau 41.

TABLEAU 41

Électrophorèse en gel d'amidon de diverses fractions D.

Fraction analysée	Quantité de protéines soumises à l'électrophorèse	Électrophorèses		
		Durée	Voltage	Tampon
W2	24 µg	4 h 30	2,5 V/cm	acide borique pH 8,4
R1	11	4 h 30	—	—
R3	67	6 h	—	—
S1	12	6 h	—	—
S2	14	6 h	—	—
S3	15	6	—	—
R3	67	20 h	—	lactate d'al. pH 3,1

Les résultats de toutes ces migrations ont été négatifs. Aucune tache n'a pu être mise en évidence même en arrêtant la migration au bout de 4 h 30.

La fraction terminale que nous isolons par chromatographie sur Dowex 50 × 2 ne correspond pas dans son ensemble au peptide caractérisé dans le chapitre v.

B. **Analyse de la fraction initiale (Fraction A).**

Rappelons que cette fraction est éluée par chromatographie sur Dowex 50 × 2 au bout de 30 ml, qu'elle est riche en P.ADN et qu'elle contient également quelques amino-acides.

1. P.ADN *et amino-acides totaux.*

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 42.

TABLEAU 42

Dosage de P.ADN et des amino-acides totaux sur différentes fractions A recueillies.

Lot de DNA utilisé et numéro de la chromatographie	Amino-acides totaux après hydrolyse alcaline (µg/ml)	P.ADN total (µg/ml)
P1	82	254
P2	65	310
P3	160	227
W1	43	236
W2	28	517
R2	14	53
S1	50	554
S2	72	73

Si l'on compare ces résultats à ceux du tableau 36, on peut s'étonner que certaines fractions aient une concentration en amino-acides supérieure à la fraction D. En fait, la majeure partie des amino-acides est bien concentrée dans la fraction terminale car le volume de cette fraction terminale est nettement supérieure (p. 114). Le faible volume recueilli explique par ailleurs le petit nombre d'analyses que l'on a pu effectuer sur la fraction initiale.

2. *Détermination des amino-acides constitutifs.*

Nous avons opéré par chromatographie sur colonne de Dowex 50 × 8 suivant le mode opératoire décrit page 119 : addition d'une solution standard d'amino-acides, résultats positifs pour une augmentation de l'ordre du dixième de micromole...

a) *Résultats.*

L'analyse a porté sur les échantillons W 1, S 1 et W 2 et les résultats sont mentionnés dans le tableau 43. Ils sont exprimés en micromoles d'amino-acides, déduction faite du mélange standard ajouté comme entraîneur.

TABLEAU 43

Composition en amino-acides de la fraction initiale A de quelques échantillons de PR.DNA.

Amino-acides	Échantillons analysés		
	W1	S1	W2
CYS AC.	0,01	0,04	
ASP	—	0,01	
THR	0,07	0,07	±
SER	0,10	0,15	±
GLU	0,08	0,06	±
PRO	0,01	—	
GLY	non déterminé		
ALA	±	±	±
VAL	0,03	0,01	
CYS	0,01	0,03	
MET	—	—	
ILEU	0,05	0,07	
LEU	0,16	0,39	±
TYR	0,03	0,12	±
PHE	0,02	0,04	±
ORN	0,04	—	
LYS	0,03	0,02	
HIS	++++	++++	±
TRY-like	0,35	0,51	±
ARG	—	0,01	±

Les résultats sont exprimés en micromoles d'amino-acides.

L'augmentation de l'histidine était trop importante pour faire l'objet d'une détermination quantitative.

L'échantillon W2 a été introduit sans surcharge et n'a pu être déterminé que qualitativement.

Les amino-acides dont la présence est hautement probable sont soulignés.

Il n'est pas tenu compte du glycocolle.

L'alanine n'a pu être déterminée quantitativement, l'élution de cet amino-acide dans le mélange standard de référence, ayant été perturbée. On peut cependant admettre qu'il est présent car la surface du pic est largement supérieure à celle du mélange standard utilisé comme entraîneur.

b) *Discussion des résultats.*

Les amino-acides dont la présence est hautement probable sont soulignés. Nous constatons que, dans l'ensemble, ces amino-acides sont différents de ceux identifiés dans la fraction D (tableau 39). Parmi ceux-ci, la sérine a retenu tout particulièrement notre attention car nous ne l'avons pas trouvée (sauf dans l'échantillon Q) dans la fraction D. La présence de cet amino-acide dans la fraction initiale riche en nucléotides, est donc un argument supplémentaire en faveur d'une association intime entre cet amino-acide et le DNA. Rappelons que nous avions trouvé (p. 94) un taux de sérine inversement proportionnel à celui des protéines associées au DNA.

D'autre part, l'augmentation très importante d'histidine et la présence de tryptophane nous laisse supposer, comme pour la fraction D, la présence d'impuretés azotées. C'est pourquoi nous avons chromatographié l'échantillon W 2 en recueillant les différentes fractions éluées, afin de les identifier par chromatographie sur papier. Après déminéralisation (voir page 64) des fractions correspondant à l'histidine et au tryptophane, et également des fractions correspondant aux autres amino-acides, nous avons effectué une chromatographie sur papier avec le butanol acétique comme système solvant.

Toutes les fractions recueillies ont été chromatographiés comparativement à l'acide aminé théoriquement contenu dans la fraction et servant de spot témoin. Nous obtenons pour cette fraction initiale A, une seule tache pour chaque amino-acide chromatographié. Donc chacune de ces fractions est pure et correspond à un produit homogène (que ce soit l'amino-acide supposé ou non). Pour les fractions correspondant en théorie à l'arginine, la leucine, l'acide glutamique, la sérine, la tyrosine et l'alanine nous retrouvons une tache au niveau des amino-acides servant de témoins. Par contre, pour les fractions correspondant à la phénylalanine, à l'histidine et au tryptophane, nous ne retrouvons pas de taches au même endroit que les spots témoins.

Il est donc certain que la fraction A ne contient pas ces amino-acides.

Si l'on reprend alors l'analyse du tableau 43, nous pouvons conclure à la présence constante dans cette fraction A de :

— sérine,
— alanine,
— leucine,

et à la présence plus irrégulière de :

— thréonine,
— acide glutamique,
— tyrosine,
— arginine.

Nous avons rassemblé, dans le tableau 44, les différents amino-acides retrouvés dans les deux fractions A et D.

Nous constatons d'après ce tableau, que plusieurs amino-acides identifiés dans les PR.DNA totaux (chapitre IV) n'ont pas été retrouvé dans l'une comme dans l'autre des deux fractions. Il s'agit notamment de la valine, de la proline, de la phénylalanine, de l'isoleucine et de tous les acides aminés basiques (à une exception près pour l'arginine).

TABLEAU 44

Amino acides identifiés dans les deux fractions obtenues par chromatographie sur dowex 50 × 2 de PR.DNA.

Amino-acides présents	Fraction A	Fraction D
Acide cystéique	—	+
ASP	—	++
THR	+	++
SER	++	+
GLU	+	+
PRO	—	—
GLY	—	++
ALA	++	+
VAL	—	—
MET	—	—
ILEU	—	—
LEU	++	—
TYR	+	—
PHE	—	—
ORN	—	—
LYS	—	—
HIS	—	—
ARG	+	—

++ présence constante
+ présence plus irrégulière
— absence

3. *Chromatographie sur papier de la fraction* A.

Les résultats précédents nous ont montré, comme pour la fraction terminale D, la présence de quelques composés azotés autres que des amino-acides, réagissant avec la ninhydrine et migrant, par chromatographie sur Dowex 50 × 8, au niveau de la phénylalanine, de l'histidine et du tryptophane.

Nous avons alors vérifié par chromatographie de cette fraction A non hydrolysée par ClH 6 N si nous étions en présence d'un composé homogène ou non. Les chromatographies ont été réalisées dans le système solvant butanol-acétique, avec les échantillons W 1 et R 2 et révélées par utilisation de la ninhydrine. Nous avons observé dans les

deux cas plusieurs taches ce qui prouve l'hétérogénéité de cette fraction (fig. 84).

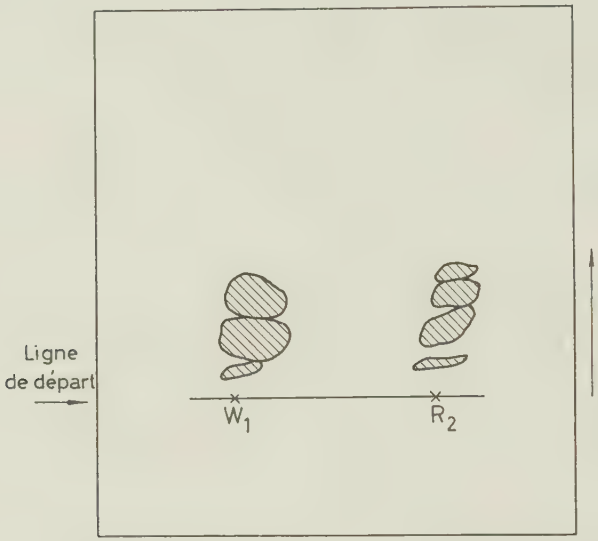


Fig. 84. — Chromatographie ascendante de diverses fractions A.
Durée : 24 heures

Solvant : *n* Butanol 80 ml
Acide acétique 20 ml
Eau distillée 100 ml
Papier Whatmann nº 3 MM.

4. *Electrophorèses en gel d'amidon.*

Nous avons enfin vérifié dans une dernière étape s'il y avait correspondance entre cette fraction et la fraction peptidique initialement mise en évidence (chapitre v).

Les principales caractéristiques des électrophorèses entreprises sont résumés sur le tableau 45.

TABLEAU 45

Électrophorèses sur gel d'amidon des fractions initiales A.

Fraction analysée	Quantité de protéines soumises à l'électrophorèse	Électrophorèses	
		Durée	Voltage
P1	412 µg	6 h	2,5 volts/cm
W1	129	—	—
R3	195	—	—

La quantité de protéines, très élevée par rapport à celles des fractions terminales D correspond en fait aux amino-acides libérés après hydrolyse alcaline. En effet, nous n'avons pas pu, faute de prise d'essai suffisante, déterminer la concentration de nos solutions avant l'hydrolyse.

Comme pour la fraction terminale, les résultats ont tous été négatifs : aucune tache n'a pu être mise en évidence.

Cette fraction initiale, comme la fraction terminale, ne correspond donc pas au peptide identifié par électrophorèse des PR.DNA avant séparation chromatographique sur Dowex 50 × 2.

C. **Conclusion de ces expériences.**

Les principales conclusions que l'on peut tirer à la suite de l'analyse de deux fractions principales obtenues par chromatographie sur Dowex 50 × 2 de PR.DNA sont les suivantes :

1) Les deux fractions sont hétérogènes (mise en évidence par chromatographie sur papier) et les résultats obtenus après plusieurs chromatographies sont assez peu reproductibles.

2) Elles contiennent des composés azotés réagissant avec la ninhydrine et autres que les amino-acides courants. Ces composés soumis à la chromatographie sur Dowex 50 × 8 sont élués :

— au niveau de la phénylalanine et du tryptophane pour la fraction D;

— au niveau de la phénylalanine, du tryptophane et de l'histidine pour la fraction A.

Ces constatations obligent à formuler certaines réserves quant à l'identité de ces amino-acides en tant que constituants des PR.DNA, réserves que nous avons déjà faites à propos du chapitre IV (p. 98).

3) Ces composés azotés, tout au moins pour la fraction D, sont très importants quantitativement puisqu'ils représentent sensiblement 80 % de l'azote total de cette fraction. Le fait qu'ils soient élués avec le tampon le moins acide (pH 5,00) leur confère un caractère basique (voir chapitre II, 4^{e} paragraphe). Il s'agit peut être d'amines. On sait en effet que les DNA des bactériophages T de *E. Coli* peuvent être associés à des polyamines ([5]).

4) Tous les amino-acides identifiés au cours du chapitre IV (amino-acides constitutifs des PR.DNA totaux) ne sont pas retrouvés dans ces deux fractions. Parmi les amino-acides récupérés dans la fraction A, la sérine semble particulièrement intéressante. Parmi ceux récupérés dans la fraction D, 3 d'entre eux (acide aspartique, thréonine et glycine) sont retrouvés d'une façon constante.

5) La fraction terminale ne contient pratiquement pas de nucléotides, la fraction initiale en est riche. Les amino-acides et les nucléotides de cette fraction sont peut-être réunis sous la forme de nucléotides peptides, dont nous avons envisagé les différentes structures page 18.

Mais il se peut également que chaque amino-acide soit lié séparément à un nucléotide. L'ensemble, étant donné son faible poids moléculaire pourrait être éliminé partiellement au cours de la dialyse, ce qui expliquerait la faible reproductibilité d'une expérience sur l'autre.

6) Aucune des deux fractions ne correspond dans son ensemble au composé peptidique mis en évidence par électrophorèse (chapitre v). Si nous reprenons alors les conclusions que nous avait suggérées ce chapitre, la deuxième hypothèse (p. 110) semble la plus vraisemblable : c'est-à-dire que nous révèlons à l'Amido-Schwartz l'ensemble des PR.DNA sous forme de petits peptides et de composés azotés non séparés par électrophorèse. Cet ensemble, par chromatographie sur Dowex 50 × 2 est séparé en 4 fractions (A, B, C, et D) dont deux (A et D) sont elles-mêmes hétérogènes.

CONCLUSION

Ce travail porte sur l'étude des amino-acides et autres substances azotées étroitement associées au DNA après son extraction et dénommés PR.DNA. Cette étude comprend :

— leur isolement et leur purification;

— leur analyse chimique et notamment leur composition en amino-acides déterminée en fonction :

du taux de protéines dans le DNA;

de la méthode d'extraction du DNA afin de vérifier que ces substances sont liées au DNA et donc que leur composition en amino-acides est indépendante du procédé d'extraction;

— la détermination de l'hétérogénéité des PR.DNA par leur fractionnements sur divers supports.

Nous avons donc utilisé plusieurs méthodes de préparation du DNA qui sont :

— la méthode de déprotéinisation en milieu de force ionique élevée de Signer et Schwander;

— la méthode de déprotéinisation par les détergents de Kay et collaborateurs;

— la méthode de déprotéinisation par le phénol en présence d'anions organiques de Kirby;

— la méthode de déprotéinisation par emploi de la papaïne de Aubin et collaborateurs.

Nous effectuons, au cours de la préparation des DNA, des purifications plus ou moins poussées; nous étalons ainsi le taux des protéines de 0,2 à 3,7 %. Cet étalement est important car il permet de déterminer le « degré d'affinité » des différents amino-acides pour le DNA. En effet, si la concentration d'un amino-acide dans les PR.DNA augmente lorsque diminue le taux de protéines, cet amino-acide n'est pas un contaminant mais est effectivement lié au DNA.

ISOLEMENT DES PR.DNA.

Nous utilisons la méthode suivante :

— hydrolyse enzymatique du DNA par la DNase I puis la phosphodiestérase de venin de serpent;

— élimination par dialyse des nucléotides formés;

— concentration du résidu de dialyse par évaporation rotative sous vide suivie d'une lyophilisation.

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Les deux acides aminés dicarboxyliques : acide aspartique et acide glutamique représentent 19 à 28 % des amino-acides analysés (les résultats sont exprimés en moles pour 100 moles analysées). Ce taux élevé est relativement constant quelle que soit la méthode de préparation du DNA et quel que soit le taux de protéines.

Le taux de la sérine, exprimé en pourcentage par rapport aux amino-acides totaux analysés, augmente au fur et à mesure de la diminution du taux des protéines : 6,3 % des amino-acides totaux pour un taux de protéines égal à 2,7 % et 12,7 % pour un taux de protéines égal à 0,2 %. Toutefois, si l'on rapporte ce taux de sérine au milligramme de P.ADN de l'échantillon, on obtient des résultats variant de 0,026 à 0,082. Ceci montre donc que dans les PR.DNA la serine n'est pas exclusivement liée au DNA. L'histidine et deux composés non identifiés avec certitude et migrant par chromatographie selon Stein et Moore au niveau de l'ornithine et de l'acide cystéique, ont des variations identiques.

Pour les autres amino-acides, les résultats sont constants quelle que soit la méthode de préparation du DNA et quelle que soit l'importance du taux de protéines, à une exception près pour l'arginine : la concentration de cet amino-acide dans les PR.DNA augmente lorsque le DNA est préparé par une déprotéinisation à la papaïne.

— Le rapport $\frac{\text{Acides Aminés basiques}}{\text{Acides aminés acides}}$ est dans tous les cas voisin de 1 et n'atteint jamais les valeurs caractéristiques des protéines basiques (1,5 à 5).

— Enfin présence de fractions inconnues et réagissant avec la ninhydrine.

On peut conclure de ces résultats que les PR.DNA ne contiennent que peu ou pas d'histones ou de fractions d'histones. Elles sont dans l'ensemble analogues ou voisines des protéines résiduelles.

FRACTIONNEMENT DES PR.DNA.

Nous avons utilisé deux techniques : l'électrophorèse et la chromatographie.

— L'électrophorèse sur divers supports et dans plusieurs tampons ne s'est pas révélée suffisamment sélective pour fractionner les PR. DNA. Il faut donc en conclure :

soit que ces résidus protéiques sont homogènes, ce qui est impossible étant donné le fractionnement obtenu par chromatographie,

soit que les différents composants des PR. DNA ont des poids moléculaires très voisins ou des charges électriques identiques.

— La chromatographie sur Dowex 50 × 2, plus sélective, nous a permis d'obtenir la séparation des PR. DNA en 4 fractions dont les deux principales sont elles-mêmes hétérogènes. Elles contiennent, outre des amino-acides, des composés azotés réagissant avec la ninhydrine et autres que les amino-acides courants. La première de ces fractions renferme l'ensemble des nucléotides récupérés, associés à quelques amino-acides parmi lesquels se trouve la sérine.

La fraction terminale contient un ensemble hétérogène d'amino-acides et de composés azotés mais est pratiquement exempte de nucléotides.

Ces différents résultats nous prouvent donc l'existence, parmi les composés azotés étroitement associés au DNA, de molécules autres que des amino-acides courants. Les résultats obtenus par certains auteurs et nos propres observations nous permettent de penser qu'il s'agirait peut-être de molécules basiques du type amine; l'association de ces molécules avec le DNA a d'ailleurs été observée chez certains bactériophages.

Ce travail a été entrepris dans un contexte général qui tend à montrer que de telles associations existeraient « in vivo » dans d'autres espèces vivantes et que ces amines ou polyamines assureraient en partie la stabilité de la structure bihélicoïdale du DNA ou interviendraient même dans les propriétés biologiques fondamentales de cette macromolécule : autoduplication et transcription spécifique de la séquance nucléotidique sur les molécules complémentaires de RNA-Messager.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Alexander P., The combination of protamine with desoxyribonucléic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, (1953), 595.

(2) Allfrey V. G., Faulkner R. et Mirsky A. E., Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **51** (1964), 786.

(3) Allfrey V. G., Littau V. C. et Mirsky A. E., On the role of histones in, regulating ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus. *Proc. Nat. Acad. Sci.*. **49** (1963), 414.

(4) Allfrey V. C., Mirsky A. E. et Stern H., The chemistry of the cell nucleus *Advanc. Enzymol.*, **16** (1955), 411.

(5) Ames B. N. et Dublin D. T., The role of polyamines in the neutralization of bacteriophage deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, **235** (1960), 769.

(6) Astbury W. T., et Bell F. O., X-ray study of thymonucleic acid. *Nature*, Lond., **141** (1938), 747.

(7) Aubin G., Recherches sur l'extraction d'acide désoxyribonucléique à partir de divers tissus et milieux. Etablissement d'une nouvelle technique faisant appel à l'emploi de papaïne. *Thèse de Pharmacie*, Université Paris, 1965.

(8) Aubin G., Chenaille P., Lamonthezie N. et Paoletti C., Extraction de l'acide désoxyribonucléique de différents tissus par emploi de la papaïne. *Biochim. Biophys. Acta*, **72** (1963), 456.

(9) Badin J. et Hervé B., La précipitation des protéines par l'Amidoschwartz et son application au microdosage des protéines sériques. *Ann. Biol. Clin.*, **23** (1965), 321.

(10) Bakay B., Kolb J. J. et Toennies G., On the component proteins of calf thymus nucleoprotein. *Arch. Biochem.*, **58** (1955), 144.

(11) Balis M. E., Salser J. S. et Elder A., A suggested role of amino-acids in deoxyribonucleic acid. *Nature*, **203** (1964), 1170.

(12) Beaven G. H. et Holiday E. R., Ultraviolet absorption spectra of protei ns and amino-acids. *Adv. in protein Chem.*, **7** (1952), 319.

(13) Bendich A. et Rosenkranz H., Some thoughts on the double stranded model of deoxyribonucleic acid. In *Progress in Nucleic Acids Res.*, Davison J. N., et Cohn W. E. Ed., **1**, (1963), 219. Academic Press.

(14) Berenblum J. Chain E., Studies on the colorimetric determination of phosphate. *Biochem. J.*, **32** (1938), 286.

(15) Berg H., Polarographische Untersuchungen an Nucleinsaüren und Nucleasen. I. Polarographischer Nachweis von Proteinen neben Nucleinsäuren. *Biochem. Z.*, **329** (1957), 274.

(16) Bianchi P. A. et Shooter K. V., The sedimentation characteristics of deoxyribonucleic acid from human tissues. *Biochem. J.*, **78** (1961), 372.

(17) Bijvoet P., Ethanol precipitation analysis of thymus histone. *Biochim. Biophys. Acta*, **25** (1957), 502.

(18) Billen D., Sedimentation of a DNA Polymerase component from bacterial extracts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **7** (1962), 179.

(19) Billen D. et Hnilica L. S., Inhibition of DNA synthesis by histones. In *The nucleohistones*, ed. By Bonner J. and Ts'o P., p. 289. Holden-Day, San Francisco, 1964.

(20) Biserte G. et Dautrevaux M., Données récentes sur les séparations chromatographiques et électrophorétiques des acides aminés et des peptides. *Prod. Prob. Pharm.*, **18** (1963), 373.

(21) Biserte G., Sautière P., Houard C. et Devis M., Étude comparative du comportement en électrophorèses en gel d'amidon des histones de thymus de veau. *C.R. Soc. Biol.*, **156** (1962), 1823.

(22) Bohuon C., Travaux non publiés.

(23) Bonner J., Huang R. C., Properties of chromosomal nucleohistones. *J. Mol. Biol.*, **6** (1963), 169.

(24) Bonner J., Huang R. C. et Gilden R. V., Chromosomally directed protein synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **50** (1963), 893.

(25) Bonner J. et Ts'o P., *The nucleohistones*, Holden-Day Ed., San Francisco, 1964.

(26) Borchers R., Spectrophotometric determination of amino-acids. *Anal. Chem.*, **31** (1959), 1179.

(27) Borenfreund E., Fitt E. et Bendich A., Isolation and properties of deoxyribonucleic acid from mammalian sperm. *Nature*, **191** (1961), 1375.

(28) Boulanger P. et Biserte G., Chromatographie sur papier des acides aminés et polypeptides des liquides biologiques. II modifications techniques et résultats nouveaux (plasma sanguin). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33** (1951), 1930.

(29) Boulanger P. et Montreuil J., Chromatographie en chimie organique et biologique. Purines, pyrimidines et dérivés. E. Lederer Ed. **2**, chap. x, pp. 471-573 (1959-1960), Masson et Cie.

(30) Bradbury E. M., Price W. C., Wilkinson G. R. et Zubay G., Polarized infroned studies of nucleoproteins. II Nucleohistones. *J. Mol. Biol.*, **4** (1962), 50.

(31) Briggs A. P., A modification of the Bell Doisy phosphate method. *J. Biol. Chem.*, **53** (1922), 13.

(32) Burton K., A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, **62** (1956), 315.

(33) Busch H., *Histones and other nuclear proteins*, Academic Press, New York, 1965.

(34) Busch H. et Davis J. R., Nuclear proteins of tumors and other tissues : a review. *Cancer Res.*, **18** (1958), 1241.

(35) Butler J. AV., The action of ionizing radiations on biological. materials. Facts and theories. *Radiation Res.*, **4** (1956), 20.

(36) Butler J. A. V., Cohn P. et Simson P., The presence of basic proteins in microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* ., **38** (1960), 386.

(37) Butler J. A. V. et Davison P. F., Deoxyribonucleoprotein, a genetic material. *Advanc. Enzymol.*, **18** (1957), 161.

(38) Butler J. A. V., Phillips D. M. et Shooter K. V., The influence of protein on heterogeneity of DNA. *Arch. Biochem. Biophys.*, **71** (1957), 423.

(39) Carver M. J. et Thomas L. E., An electrophoretic study of lipoproteins from cellular nuclei. *Arch. Biochim. Biophys.*, **40** (1952), 342.

(40) Champagne M., Mazen A. et Pouyet J., Sur le dosage des amino-acides résiduels dans les hydrolysats d'acide désoxyribonucléique. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **257** (1963), 2741.

(41) Champagne M., Mazen A. et Pouyet J., Amino-acids residues in deoxyribonucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **87** (1964), 682.

(42) Chargaff E., Recent work on lipoproteins as cellular constituents. *Proc. Internat. Cong. Exp. Cytol.*, Stockholm, 1947.

(43) Chou S. C. et Goldstein A., Chromogenic groupings in the Lowry protein determination. *Biochem. J.*, **75** (1960), 109.

(44) Courtois J. E. et Agneray J., Dosage des phosphates par le réactif nitro-vanadomolybdique de Misson. Etude spectrophotométrique. Application à l'analyse automatique. *Ann. Biol. Clin.*, **19** (1961), 101.

(45) Coval M. L., Moller V., et Van Vunakis H., Amino-acid composition of bacteriophage components. *Feder. Proc.*, **19** (1960), 410.

(46) Craig L. C., Differential dialysis. *Science*, **144** (1964), 1093.

(47) Crampton C. F., Moore S. et Stein W. H., Chromatographie fractionations of calf thymus histones. *J. Biol. Chem.*, **215** (1955), 787.

(48) Crampton C. F., et Petermann M. L., The amino-acid composition of proteins isolated from the ribonucleoproteins particles of rat liver. *J. Biol. Chem.*, **234** (1959), 2642.

(49) Cruft H. J., Mauritzen C. M. et Stedman E., Abnormal properties of histones from malignant cells. *Nature*, Lond., **174** (1954), 580.

(50) Cruft H. J., Mauritzen C. M. et Stedman E., The nature and physicochemical properties of histones. *Phil. Trans. Roy. Soc.* B., **241** (1957), 93.

(51) Dallam R. D., The chemical composition of nucleic and cytoplasmic granules. *Arch. Biochem. Biophys.*, **54** (1955), 24.

(52) Dallam R. D. et Thomas L. E., Chemical studies on mammalian sperm. *Biochim. Biophys. Acta*, **11** (1953), 79.

(53) Daly M. M., Allfrey V. G. et Mirsky A. E., Uptake of glycine N^{15} by components of cell nuclei. *J. Gen. Physiol.*, **36** (1952), 173.

(54) Daly M. M., Mirsky A. E. et Ris H., The amino acid composition and some properties of histones. *J. Gen. Physiol.*, **34** (1951), 439.

(55) Dautrevaux M., Dosage des acides aminés par une méthode automatique dérivée de celle de Piez et Morris. *Bull. Soc. chim. Biol.*, **44** (1962), 1105.

(56) Davidson J. N. et Smellie R. M. S., Phosphorus compounds in the cell. 2 the separation by ionophoresis on paper of the constituents nucleotides of ribonucleic acid. *Biochem. J.*, **52** (1952), 594.

(57) Davies J. W., Harris G. et Neal G. E., Peptide Bound polynucleotides in brewer's yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, **51** (1961), 95.

(58) Davison P. F., Histones from normal and malignant cells. *Biochem. J.*, **66** (1957), 703.

(59) Davison P. F. et Butler J. A. V., The chemical composition of calf thymus nucleoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, **21** (1956), 568.

(60) Davison P. F., James D. W. F., Shooter K. V. et Butler J. A. V., The histones of calf thymus deoxyribonucleoprotein II. Electrophoretic and sedimentation behaviour and a partial fractionation. *Biochim. Biophys. Acta*, **15** (1954), 415.

(61) Delarue J. C. et Bohuon C., Dosage simultané de l'azote et du phosphore dans les acides désoxyribonucléiques par une méthode entièrement automatique. *Path. Biol.*, à paraître.

(62) Delsal J. L. et Manhouri H., Étude comparative des dosages colorimétriques du phosphore. Recherche d'une méthode de haute sensibilité applicable au dosage du phosphore organique dans les spots après chromatographie. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **37** (1955), 1041.

(63) De Mende S., Klyszesko L. et Khouvine Y., Désoxyribonucléoprotéines du pancréas de bœuf. II. Propriétés physico-chimique. Comportement électrophorétique des histones totales. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **42** (1960), 775.

(64) Dische Z., Color reactions of nucleic acids and their components, in *The nucleic acids*, **1** (1955), 285. Chargaff E. Davidson J. N. Ed.. Academic Press, New York.

(65) Dounce A. L. et Hilgartner C. A., A study of DNA nucleoprotein gels and the residual protein of isolated cell nuclei. *Exper. Cell. Res.*, **36** (1964), 228.

(66) Engbring V. K. et Laskowski M., Protein components of chicken erythrocytes nuclei. *Biochim. Biophys. Acta*, **11** (1953), 244.

(67) Felix K., Fischer H. et Krekels A., Protamines and nucleoprotamines. *Progr. Biophys. Biophys. Chem.*, **6** (1956), 1.

(68) Ferrari A., Nitrogen determination by a continuous digestion and analysis system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **87** (1960), 792.

(69) Festy B., Les inhibiteurs de désoxyribonucleases. Intérêt biochimique et application à la toxicologie du beryllium. *Thèse Doctorat d'Etat Pharmacie*, Paris, 1964.

(70) Feughelman M., Langridge R., Seeds W. E., Stokes A. R., Wilson H. R., Hooper C. W., Wilkins M. H. F., Barclay R. K. et Hamilton L. D., Molecular structure of deoxyribose nucleic acid and nucleoprotein. *Nature*, Lond., **175** (1955), 834.

(71) Fiske C. H. et Subbarow X., The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **66** (1925), 375.

(72) Flamm W. G. et Birnstiel M. L., Inhibition of DNA replication and its effet on histone synthesis. *Experimental Cell. Res.*, **33** (1963), 616.

(73) Fowden L., The composition of the bulk proteins of chlorella. *Biochem. J.*, **50** (1952), 355.

(74) Fraser D., Comparison of the amino-acide composition of T_2 and T_3 bacteriophages *J. Biol. Chem.*, **227** (1957), 711.

(75) Frearson et Kirby, Nucleoproteins. Fractionation of deoxyribonucleoproteins into acidic proteins and lysine rich histone associated with deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, **90** (1964), 578.

(76) Golder R. H., Martin-Guzman G., Jones J., Goldstein N. D., Rotenberg S. et Rutman R. J., Experimental chemotherapy studies. II. Properties of DNA from ascites cells treated in vivo with nitrogen mustard. *Cancer Res.*, **24** (1964), 964.

(77) Goodwin T. W. et Morton R. A., The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins. *Biochem. J.*, **40** (1946), 628.

(78) Gornall, Bardawill et David, Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, **177** (1949), 751.

(79) Goto H., Studies on the amino-acids in yeast RNA in Bound form. IV. The amino-acids bound to the major nucleotides and to the minor fractions from yeast RNA. *J. Biochem.*, **56** (1964), 533.

(80) Grassmann W. et Deffner G., Verteilungschromatographishes Verhalten von Proteinen und Peptiden in phenolhaltigen Losungsmitteln. *Hoppe. Seyl. Z.*, **293** (1953), 89.

(81) Grassmann W. et Hannig K., Ein quantitative Verfahren zur Analyse der serum Proteine durch Papierelektrophorese. *Hoppe. Seylers. Z. Physiol .Chem.*, **290** (1952), 1.

(82) Grassmann W., Hanning K. et Knedel M., Über ein Verfahren zur electrophoretischen Bestimmung der serum Proteine auf Filtrierpapier. *Dtsch. Med. Wschr.* **76** (1951), 333.

(83) Grunberg Manago M., *In Ann. Rev. Biochem.*, **31** (1962), 301.

(84) Habermann V., Evidence for peptides in RNA prepared by phenol extraction. *Biochim. Biophys. Acta*, **32** (1959), 297.

(85) Hamer D., Aspects of the chemistry of the proteins in the nucleus, a short review and some experimental results. *Brit. J. Cancer*, **5** (1951), 130.

(86) Hamer D., A comparison of different protein fractions obtained from thymus nuclei isolated in an aqueous medium. *Brit. J. Cancer*, **7** (1953), 151.

(87) Hamilton P. B., Ion exchange chromatography of amino-acids. Effects of resin particle size on column performance. *Anal. Chem.*, **30** (1958), 914.

(88) Hamilton P. B., Ion. Exchange chromatography of amino-acids. A simple column, high resolving fully automatic procedure. *Anal. Chem.*, **35** (1963), 2055.

(89) Hamilton P. B., Amino-acids on hands. *Nature*, **205** (1965), 284.

(90) Hase E., Mihara S., Otsuka H. et Tamiya H., New peptide nucleotide compounds obtained from chlorella and yeasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **32** (1959), 298.

(91) Hirs C. H. W., Stein W. H. et Moore S., The amino-acid composition of ribonuclease. *J. Biol. Chem.*, **211** (1954), 941.

(92) Hotchkiss R. D., in *Phophorus metabolism* W. D. McElroy and B. Glass, p. 426, J. Hopkins Press, Baltimore (1952).

(93) Huang R. C. et Bonner J., Histone, a suppressor of chromosomal RNA synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **48** (1962), 1216.

(94) Hurwitz J. et August J. T., in *Progress in Nucleic acid research*, J. N. Davidson et W. E. Cohn éd., **1** (1963), 59 Academic Press, New York.

(95) Jacob F. et Brenner S., Sur la régulation de la synthèse du DNA chez les bactéries : l'hypothèse du replicon. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **256** (1963), 298.

(96) Jacob F., Brenner S. et Cuzin F., On the regulation of DNA replication in Bacteria. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **28** (1963), 329.

(97) Jacob F. et Monod J., Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.*, **3** (1961), 318.

(98 *a*) Johns E. W., Phillips D. M. P., Simson P. et Butler J. A. V., Improved fractionations of arginine. Rich histones from calf thymus *Biochem. J.*, **77** (1960), 631.

(98 *b*) Johns E. W., Phillips D.M.P., Simson P. et Butler J. A. V. The electrophoresis of histones and histone fractions on starch gel *Biochem. J.*, **80** (1961), 189.

(99) Jonsen J., Laland S. et Smith-Keilland I., Nucleotides containing amino-acids in bacteria. *Acta Chem. Scand.*, **13** (1959), 836.

(100) Jordan D. O. *The chemistry of nucleic acids*, p. 221, éd. by Butterworths, London (1960).

(101) Kay E. R. M., Simmons N. S. et Dounce A. L., An improved preparation of sodium deoxyribonucleate. *J. Amer. Chem. Soc.*, **74** (1952), 1724.

(102) Keil B. et Hrubesoka M., O peptidicke primesi pankreaticke rinonukleove kyseliny, *Chem. Listy*, **49** (1955), 274.

(103) Kekki M., Microdetermination of amino-nitrogen as copper complexes Modification for plasma and urine. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.*, **11** (1959), 311.

(104) Kirby K. S., A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids : evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein. *Biochem. J.*, **66** (1957), 495.

(105) Kirby K. S., Preparation of some deoxyribonucleic acid. protein complexes from rat liver homogenates. *Biochem. J.*, **70** (1958), 260.

(106) Kirby K. S., The preparation of deoxyribonucleic acids by the *p*-amino salicylate phenol method. *Biochim. Biophys. Acta*, **36** (1959), 117.

(107) Kirkham W. R., et Thomas L. E., Isolation of globulins from cellular nuclei. *J. Biol. Chem.*, **200** (1953), 53.

(108) Klyszejko L. et Khouvine Y., Désoxyribonucléoprotéines du pancréas de bœuf. I. Obtention et composition des histones des acides désoxyribonucléiques et des protéines non basiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **42** (1960), 761.

(109) Knobloch A., Matsudaira H. et Vendrely R., Etude biochimique comparée des désoxyribonucléoprotéines isolées de spermatozoïdes de quelques espèces de poissons. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **246** (1958), 2679.

(110) Kornberg A., *Enzymatic synthesis of DNA*, New York, John Wiley and Sons, 1961.

(111) Kossel A., *Protamine und histone*, Leipzig, 1929.

(112) Kunitz M., Digestion of thymus nucleic acid (DNA) The kinetics of the reaction. *J. Gen. Physiol.*, **33** (1950), 363.

(113) Lark C. et Lark K. G., Evidence for two distincts aspects of the mechanism regulating chromosome replication in *Escherichia Coli*. *J. Mol. Biol.*, **10** (1964), 120.

(114) Leach S. J., The rate of hydrolysis of proteins and peptides. *Rev. Pure Appl. Chem.*, **3** (1953), 25.

(115) Le Pecq J. B., De la mesure des dimensions moléculaires des polymères biologiques et de sa signification : application à l'étude physico-chimique et enzymatique de la complexation de l'acide desoxyribonucléique. *Thèse Doctorat Pharmacie Etat*, Paris, 1963.

(116) Leroy-Kuehl, Isolation and characterization of an unusual protein from the cell nucleus *Biochim . Biophys., Acta*, **71** (1963), 531.

(117) Lesko S. A., Kulkarni M. V. et Emery A. J., Nature of binding between DNA and protein in deoxyribonucleoprotein. *Feder. Proc.*, **23** (1964), 373.

(118) Le Talaer J. Y., Recherches sur les mécanismes de défence enzymatique contre les acides desoxyribonucléiques considérés comme support de toxicité moléculaire. *Thèse Doctorat d'Etat Pharmacie*, Paris, 1963.

(119) Lindsay R. H., Paik W. K. et Cohen P. P., Hydrolytic degradation of purine derivatives to glycine. *Biochim. Biophys. Acta*, **58** (1962), 585.

(120) Little J. A. et Butler G. C., The enzymatic degradation of thymonucleic acid. I. The preparation of oligonucleotides. *J. Biol. Chem.*, **188** (1951), 695.

(121) Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farrand A. L. et Randall R. J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** (1951), 265.

(122) Luck J. M., Cook H., Eldredge N. T., Haley M. I., Kupke D. W., Rasmussen P. S., On the fractionation of thymus histone. *Arch. Biochem. Biophys.* **65** (1956), 449.

(123) Luck J. M., Rasmussen P. S., Satake K. et Tsvetikov A. N., Further studies on the fractionation of calf thymus histone. *J. Biol. Chem.*, **233** (1958), 1407.

(124) Luzzati V. et Nicolaieff A., Etude par diffusion des rayons X aux petits angles des gels d'acide désoxyribonucléique et de nucléoprotéines. *J. Mol. Biol.*, **1** (1959), 127.

(125) Mandelstam J. et Rogers H. J., Chloramphenical resistant incorporation of amino-acids into staphylococci and cell wall synthesis. *Nature*, **181** (1958), 956.

(126) Marmur J., A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.*, **3** (1961), 208,

(127) Mayer D. T., et Gulick A., The nature of the proteins of cellular nuclei. *J. Biol. Chem.*, **146** (1942), 433.

(128) Mirsky A. E. et Pollister A. W., Chromosin, a desoxyribose nucleoprotein complex of the cell nucleus. *J. Gen. Physiol.*, **30** (1946), 117.

(129) Mirsky A. E. et Pollister A. W., Chromosin, a desoxyribose nucleoprotein complex of the celle nucleus. *J. Gen. Physiol.*, **41** (1958), 595.

(130) Mirsky A. E. et Ris H., Isolated chromosomes. *J. Gen. Physiol.*, **31** (1947), 1.

(131) Mirsky A. E. et Ris H., Variable and constant components of chromosomes. *Nature*, **163** (1949), 666.

(132) Mirsky A. E. et Ris H., The composition and structure of isolated chromosomes. *J. Gen. Physiol.*, **34** (1951), 475.

(133) Misson G., Colorimetrische Phosphorbestimmung und Stahl. *Chemiker Zeitung*, **32** (1908), 633.

(134) Monty K. J. et Dounce A. L., The properties and the enzymatic degradation of desoxyribonucleoproteins from liver cell nuclei. *J. Gen. Physiol.*, **41** (1958), 595.

(135) Moore S., Spackman D. H. et Stein W. H., Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system. *Anal. Chem.*, **30** (1958), 1185.

(136) Moore S. et Stein W. H., Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins, *J. Biol. Chem.*, **192** (1951), 663.

(137) Moore S. et Stein W. H., Procedures for the chromatographic determination of amino acids on 4 % cross linked sulfonated polystyrene resins. *J. Biol. Chem.*, **211** (1954), 893.

(138) Moore S. et Stein W. H., A modified nihydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.*, **211** (1954), 907.

(139) Moore S. et Stein W. H., Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. *Methods in Enzymol.*, **6** (1963), 819.

(140) Morowitz H. J., in *Microsomal particles and protein synthesis*, Ed. by R. B. Roberts, Oxford, Pergamon (1958).

(141) Moule Y., Etude des acides nucléiques et de certains dérivés organiques et inorganiques du phosphore dans les tissus animaux. *Arch. Sci. Physiol.*, **7** (1953), 161.

(142) Munier R. L., Chromatographie d'échange d'ions sur colonne dans *Techniques de laboratoire* J. Loiseleur, tome I, fasc. 1, p. 491, édité par Masson, Paris (1963).

(143) Munier R. L., Microchromatographie sur papier dans *Technique de Laboratoire*, J. Loiseleur, Tome I, fasc. 1, p. 688 édité par Masson, Paris (1963).

(144) Murray K., The occurence of ε N. methyl lysine in histones. *Biochemistry*, **3** (1964), 10.

(145) Neelin J. M. et Connel G. E., Zone électrophoresis of chicken erythrocyte histone in starch gel. *Biochim. Biophys. Acta*, **31** (1959), 539.

(146) Neelin J. M. et Neelin E. M., Zone electrophoresis of calf thymus histone in starch gel. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **38** (1960), 355.

(147) Olenick J. G. et Hahn F. E., Amino acids in hydrolysates of deoxyribonucleic acid of Escherichia Coli *Biochim. Biophys. Acta*, **87** (1964), 535.

(148) Ondarza R. N., A new dinucleotide peptide from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **50** (1962), 728.

(149) Paoletti C. et coll. Travaux non publiés.

(150) Peterson E. A. et Sober H. A., Variable gradient device for chromatography. *Anal. Chem.*, **31** (1959), 857.

(151) Phillips D. M. P., The histones. *Progr. Biophys. Biophys. Chem.*, **12** (1962), 213.

(152) Phillips D. M. P., The histones. *Progr. Biophys. Biophys. Chem.*, **12** (1962), 225.

(153) Phillips D. M. P., *Proc. World Conf. Histone Biology and chemistry*, p. 46, Holden, Day, San Francisco (1963).

(154) Phillips D. M. P. et Johns E. W., A study of the proteinase content and the chromatography of thymus histone. *Biochem. J.*, **72** (1959), 538.

(155) Phillips D. M. P. et Simson P., Identification of some peptides from an arginine rich histone and their bearing on the structure of deoxyribonucleohistone. *Biochem. J.*, **82** (1962), 236.

(156) Piez K. A. et Morris L., A modified procedure for the automatic analysis of amino acids. *Anal. Biochem.*, **1** (1960), 187.

(157) Plum C. M., Hermausen L. et Petersen J., Fractionated protein determination on small quantities. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **7**, suppl. 18 (1955).

(158) Potter J. L., Brown K. O. et Laskowski M., Enzymic degradation of DNA by cristalline deoxyribonuclease. *Biochim. Biophys. Acta*, **9** (1952), 150.

(159) Potter J. L., Laurila U. R. et Laskowski M., Studies of the specificity of deoxyribonuclease I. Hydrolysis of a trinucleotide. *J. Biol. Chem.*, **233** (1958), 915.

(160) Pritchard R. H. et Lark K. G., Induction of replication by thymine starvation at the chromosome origine in *Escherichia Coli*. *J. Mol. Biol.*, **9** (1964), 288.

(161) Privat de Garilhe M. Cunningham L., Lamila U. R. et Laskowski M., Studies on isomeric dinucleotides derived from deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, **224** (1957), 751.

(162) Rauen H. M., Stamm W. et Felix K., Uber Clupein. XII. Mitteilung. *Zs Physiol. Chem.*, **291** (1952), 275.

(163) Rees M. W., The estimation of threonine and serine in proteins *Biochem. J.*, **40** (1946), 632.

(164) Ruttkay Nedeky G. et Spanik V., A sensitive polarographic test for the detection of protein impurities in viral nucleic acid. *Nature*, **4842** (1962), 735.

(165) Ryter A. et Jacob F., Etude au microscope électronique des relations entre mesosomes et noyaux chez bacillus subtilis. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **257** (1963), 3060.

(166) Sanger F. The arrangement of amino acids in proteins in *Advances in protein chem*, **7** (1952), 1.

(167) Satake K., Rasmussen P. S. et Luck J. M., Arginine peptides obtained from thymus histone fractions after partial hydrolysis with streptomyces griseus proteinase. *J. Biol. Chem.*, **235** (1960), 2801.

(168) Schilling E. O., Burchill P. J. et Clayton R. A., Anomalous reactions of ninhydrin. *Anal. Biochem.*, **5** (1963), 1.

(169) Schram E., Moore S. et Bigwood E. J., Chromatographic determination of cystine as cysteic acid. *Biochem. J.*, **57** (1954), 33.

(170) Schwander H. et Signer R., Darstellung von hochmolekularen Natriumthymonucleinat aus Kalbsthymus. *Helv. Chim. Acta.*, **33** (1950), 1521.

(171) Shack J., On the recognition and estimation of denatured deoxyribonucleate. *J. Biol. Chem.*, **233** (1955), 677.

(172) Shepherd G. R. et Hopkins P. A., Determination of protein contamination of deoxyribonucleic acid by the folin-lowry method. *Anal. Chem.* **35** (1963), 1548.

(173) Signer R. et Schwander H., Isolierung hoch molekularen Nucleinsaüre aus Kalbsthymus. *Helv. Chim. Acta* **32** (1949), 853.

(174) Sinsheimer R. L., The action of pancreatic deoxyribonuclease. II. Isomeric dinucleotides. *J. Biol. Chem.*, **215** (1955), 579.

(175) Sinsheimer R. L. et Koerner J. F., Ion exchange separation of deoxyribonucleotides. *Science*, **114** (1951), 42.

(175 *bis*) Sinsheimer R. L. et Koerner J. F., A purification of venom phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.*, **198** (1952), 293.

(176) Smith J. O., The electrophoretic separation of nucleic acid components in the *Nucleic Acids*, **1** (1955), 276 Chargaff E. et Davidson J. M., Ed., Acad. Press., New York.

(177) Smith E. L. et Stockell A., Amino acid composition of crystalline carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.*, **207** (1954), 501.

(178) Smith E. L., Stockell A. et Kimmel J. R., Crystalline papaïn III Amino acid composition. *J. Biol. Chem.*, **207** (1954), 551.

(179) Smithies O., Zone electrophoresis in starch gels : group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, **61** (1955), 629.

(180) Spackamn D. H., Stein W. H. et Moore S., Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino-acids. *Anal. Chem.*, **30** (1958), 1190.

(181) Stedman E. et Stedman E., Chromosomin, a protein constituent of chromosomes. *Nature*, **152** (1943), 267.

(182) Stedman E. et Stedman E., Chromosomin and nucleic acids. *Nature*, **153** (1944), 500.

(183) Stedman E. et Stedman E., Cell specificity of histones. *Nature*, **166** (1950), 780.

(184) Stedman E. et Stedman E., The basic proteins of cell nuclei. *Phil. Trans. Roy. Soc., B.*, **235** (1951), 565.

(185) Steele W. J. et Busch H., Studies on the composition of nuclear residual proteins from rat liver and walker 256 carcinosarcoma. *Exper. Cell. Research*, **33** (1964), 68.

(186) Stein W. H. et Moore S., Chromatographic determination of the amino acid composition of proteins. *Cold Sp. Harb. Symp. Quant. Biol.*, **14** (1950), 179.

(187) Stein W. H. et Moore S., The free amino-acids of human blood plasma. *J. Biol. Chem.*, **211** (1954), 915.

(188) Steiner R. F. et Beers R. F., *Polynucleotides. Natural and synthetic nucleic acids*, p. 298, éd. by Elsevier Publishing Company (1961).

(189) Stevens A., Ribonucleic acids. Biosynthesis and degradation in *Ann. Rev. Biochem.*, **32** (1963), 15.

(190) Sueoka N., Correlation between base composition of deoxyribonucleic acid and amino-acid composition of protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **47** (1961), 1141.

(191) Thomas R., Recherches sur la dénaturation des acides désoxyribonucléiques. *Biochim. Biophys. Acta*, **14** (1954), 231.

(192) Truhaut R., Bohuon C. et Le Talaer J. Y., Microdosage colorimétrique du phosphore. Applications au dosage du phosphore nucléique ou au dosage du phosphore minéral du sérum. *Ann. Biol. Clin.*, **19** (1961), 859.

(193) Truhaut R., Boudene C. et Le Talaer J. Y., Fixation préférentielle du beryllium dans les noyaux de foie de rats à forte activité mitotique. *Ann. Biol. Clin.*, **23** (1965), 45.

(194) Ui N., On the aggregation of Calf thymus histone. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **30** (1957), 806.

(195) Ui N., Preparation, Fractionation and properties of calf thymus histone. *Biochim. Biophys. Acta*, **25** (1957), 493.

(196) Velick S. F. et Udenfriend S., The amino End Group and the amino acid composition of salmine. *J. Biol. Chem.*, **191** (1951), 233.

(197) Vendrely R., Données récentes sur la chimie de l'ADN et des désoxyribonucleoprotéines. *Arch. Klauss Stift. Veretbforsch*, **32** (1957), 538.

(198) Vendrely R., Alfert M., Matsudaira H. et Knobloch A., The composition of nucleohistone from pycnotic nuclei. *Exp. Cell Res.*, **14** (1958), 295.

(199) Vendrely R., Knobloch A., Vendrely C. et Matsudaira H., The deoxyribonucleoproteins of the cellular nucleus. A biochemical approach to the mechanism of transformation of the nucleohistone into nucleoprotamine. *Trans. Faraday Soc.*, **55** (1959), 498.

(200) Vendrely R., Knobloch-Mazen A. et Vendrely C., in the *Cell Nucleus*, p. 200, Butterworth Scientific Publications, London (1960).

(201) Vendrely R., Knobloch-Mazen A. et Vendrely C., Données biochimiques récentes sur la relation entre acide désoxyribonucléique et protéines basiques dans le noyau. *Biochem. Pharmacol.*, **4** (1960), 19.

(202) Vendrely R. et Vendrely C., Arginine and deoxyribonucleic acid content of erythrocyte nuclei and sperms of some species of fishes. *Nature*, **172** (1953), 30.

(203) Waldschmidt-Leitz E., Kuhn K. et Zinnert F., Zur bausteinanalyse des clupeins. *Experienta*, **7** (1951), 183.

(204) Wang T. Y., Kirkham W. R., Dallam R. D., Mayer D. T. et Thomas L. E., Acidic proteins of cellular nuclei. *Nature*, **165** (1950), 974.

(205) Wang T. Y., Mayer D. T. et Thomas L. E., Lipoprotein of rat liver nuclei. *Exper. Cell. Research.*, **4** (1953), 102.

(206) Watson J. D. et Crick F. H. C., a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, **171** (1953), 737.

(207) Wilken O. R. et Hansen R. G., A nucleotide peptide isolated from bovine liver. *J. Biol. Chem.*, **236** (1961), 1051.

(208) Wilkins M. H. F., Physical studies of the molecular structure of deoxyribose nucleic acid and nucleoprotein. *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, **21** (1956), 75.

(209) Wilkins M. H. F., Molecular structure of deoxyribose nucleic acid and nucleoprotein and possible implications in protein synthesis. *Symp. Biochem. Soc.*, **14** (1957), 13.

(210) Wilkins M. H. F., Molecular structure of deoxyribonucleoproteins. *Rapp. Cons. Chim. Solvay*, **11** (1959), 45.

(211) Wilkins M. H. F., Zubay G. L. et Wilson H. R., X-Ray diffraction studies of the molecular structure of nucleohistone and chromosomes. *J. Mol. Biol.*, **1** (1959), 179.

(212) Wilkins M. H. F., Zubay G. L., Wilson H. R., X-Ray diffraction studies of the structure of deoxyribonucleoprotein. *Trans. Faraday Soc.*, **55** (1959), 497.

(213) Yemm E. W. et Cocking E. C., The determination of amino acids with ninhydrin. *The analyst*, **80** (1955), 209.

(214) Zahn R. K. et Stamm W., Lohengehalt und eigenschaften von protaminkomponenten. *Naturwissenschaften*, **41** (1954), 95.

(215) Zalta J. P., Roznowajg R., Carasso N. et Favard P., Isolement d'une fraction de noyaux cellulaires dont la pureté est contrôlée au microscope électronique. *C.R. Acad. Sci.* **255** (1962), 412.

(216) Zubay G., Nucleohistone structure and function in *The nucleohistones*, p. 95, Bonner J., Ts'o P., éd. Holden Day, San Francisco (1964).

(217) Zubay G. et Doty P., The isolation and properties of deoxyribonucleoprotein particles containing single nucleic acid molecules. *J. Mol. Biol.*, **1** (1959), 1.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction 1

Chapitre I. Les désoxyribonucléoprotéines 5

I. Les constituants des désoxyribonucléoprotéines 5

A. L'acide désoxyribonucléique 5

B. Les protéines nucléaires 6

1. Les protamines 7

2. Les histones 8

3. Les protéines résiduelles 11

4. Autres fractions protéiniques 13

II. Structure des désoxyribonucléoprotéines 15

1. Désoxyribonucléoprotamines 15

2. Désoxyribonucléohistones 16

III. Les nucléotides-Peptides 18

IV. Les contaminants protéiques extraits avec le DNA 20

V. Conclusion. 28

Chapitre II : Techniques utilisées 29

I. Dosage des protéines 29

1. Technique du Biuret 29

2. Technique polarographique 30

3. Technique de Lowry 30

4. Dosage par formation de complexes cuivriques 38

II. Dosage simultané Azote-Phosphore 39

III. Autres analyses effectuées sur les solutions de DNA 46

IV. Séparation et dosage des acides aminés par chromatographie sur colonne 51

A. Principe 51

B. Technique 52

C. Résultats obtenus 56

D. Discussion 57

E. Application aux impuretés protéiques contaminant les DNA 61

V. Autres techniques utilisées 64

Chapitre III : Les différentes méthodes de préparation du DNA. 68
A. Rupture des cellules 68
B. Elimination du RNA 68
C. Extraction des désoxyribonucléoprotéines 69
D. Déprotéinisation des solutions 69
1. Déprotéinisation par les sels 69
2. Déprotéinisation par les détergents 69
3. Déprotéinisation par le phénol 69
4. Déprotéinisation enzymatique 70
E. Précipitation d'un DNA 70
F. Préparation d'un DNA à partir de cellules d'ascite d'Ehrlich..... 70
G. Variations du taux des protéines et leur intérêt 71

Chapitre IV : Isolement des PR.DNA et leur analyse globale en amino-acides 73
A. Technique d'isolement des PR.DNA 74
1. Description de la méthode 74
2. Particularités de cette méthode 77
3. Précautions nécessaires 77
B. Composition en amino-acides des PR.DNA 78
1.2. Technique et caractéristiques chromatographiques 78
3. Résultats obtenus 79
4. Discussion 88
C. Cas particulier d'un DNA préparé à partir de cellules d'Ascite d'Ehrlich 98
D. Conclusion de ces expériences 100

Chapitre V : Migration électrophorétique des PR.DNA 102
A. Résultats 102
1. Electrophorèses sur papier 102
2. Electrophorèses en gel d'amidon..... 103
B. Discussion 106
C. Conclusion 109

Chapitre VI : Fractionnement chromatographique des PR.DNA 111
I. Chromatographie sur Dowex 50 × 2 111
II. Analyse des fractions isolées par chromatographie sur Dowex 50 × 2 . 115
A. Analyse de la fraction terminale 117
1. P.ADN et amino-acides totaux 117
2. Ribose 118
3. Azote et Phosphore totaux 118
4. Constituants « ninhydrine positifs » 119
5. Chromatographie sur papier 122
6. Electrophorèses 125

B. Analyse de la fraction initiale 126
1. P. ADN et amino-acides totaux 126
2. Amino-acides constitutifs 126
3. Chromatographie sur papier 129
4. Electrophorèses 130
C. Conclusion de ces expériences 131

Conclusion 133

Bibliographie 137

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Le vanadium. Aspects toxicologique et biochimique.

Vu et approuvé :
Le Président de la thèse,
R. TRUHAUT.

Vu et approuvé :
Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
C. VALETTE.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
Jean ROCHE.

IMPRIMÉ PAR L'IMPRIMERIE DURAND, LUISANT-CHARTRES (E.-ET-L.), FRANCE